

CECÍLIA MIOKO YAMADA

UFV	BIBLIOTECA: BBT	OBRA: RG000898284
	CLASSIFICAÇÃO: T 589.95 / Y19d / 1999	
TÍTULO: Detecção de microrganismos endofíticos em		
		
148947 BBT		

**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS
EM FRUTOS DE CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

DOAÇÃO

BIBLIOTECA CENTRAL - U F V -
148.947
08/12/99

T
589,95
Y19d
1999
ex. 1

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
NOVEMBRO - 1999

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Y19d Yamada, Cecília Mioko, 1971-
1999 Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de
café / Cecília Mioko Yamada. – Viçosa : UFV, 1999.
56p. : il.

Orientador: Daison Olzany Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa

1. Microorganismos endofíticos - Detecção - Sorodiag-
nóstico. 2. Microorganismos endofíticos - Detecção - Imu-
nofluorescência. 3. *Klebsiella oxytoca*. 4. Café - Sementes -
Microorganismos endofíticos - Detecção. 5. Café - Microor-
ganismos endofíticos - Observação *in situ*. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 589.95

CDD 20.ed. 589.95

CECÍLIA MIOKO YAMADA

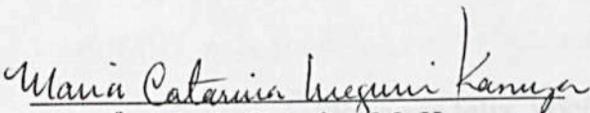
**DETECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS
EM FRUTOS DE CAFÉ**

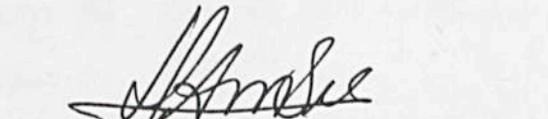
Ao maravilhoso Deus.

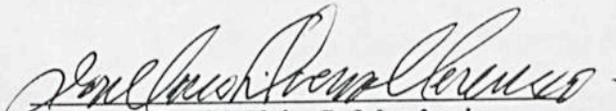
À minha querida família.

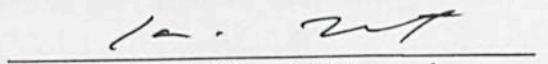
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Magister Scientiae".

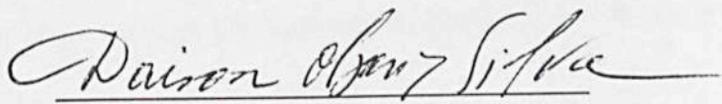
APROVADA: 13 de agosto de 1999.


Prof.^a. Maria Catarina M. Kasuya
(Conselheira)


Prof. Eldo A. Monteiro da Silva
(Conselheiro)


Prof. José Mário S. Mezêncio


Prof. Kiyoshi Matsuoka


Prof. Daison Olzany Silva
(Orientador)

AGRADECIMENTO

Ao maravilhoso Deus.

À minha querida família,

em especial, à minha *grande* mãe.

À minha alma gêmea,

meu sempre Gilson.

Secretado a Deus que, nunca, me deixou de iluminar meus caminhos

e de abrir-me os olhos, mesmo que de formas tão sutis.

À minha família que, mesmo à distância, transmitiu a compreensão, o apoio e o carinho de que tanto necessitei no decorrer deste Curso.

A meu amado *Gilson*, simplesmente e humildemente por tudo.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o curso.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. ... “Para ser feliz, você precisa ser feliz e ponto final.
E não ser feliz por causa de...” (Anônimo)

À Profª Maria Caterina Megumi Kasuya que, sempre, com seu “jeitinho”, promoveu valiosas discussões, transmitindo simpatia, conhecimento e atenção.

Ao Prof. José Mário do Silveiro Mezcário, pela constante ajuda na condução dos experimentos, pelos bons exemplos compartilhados e pela amizade desenvolvida.

Aos Prof. Eldo Antônio Monteiro da Silva e Kiyoshi Matsushita, pelos conhecimentos transmitidos, pelas boas sugestões e discussões e pela atenção dispensada.

Ao Prof. Joaquim Patrocyo Salcerio, pela avaliação crítica, pela menção ao estado e pelas excelentes discussões.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Imunologia e Virologia, Micorriza, Anatomia Vegetal, Hematozoários, pela oportunidade de pelo uso, que viabilizou a execução dos experimentos.

Aos funcionários, **AGRADECIMENTO** que, com suas brincadeiras, humanidade, humildade e conhecimentos, tornaram a parte de condução do experimento divertida e especial.

Aos funcionários Aline e Márcia, Nilceia, Aparecida, Rozane e Zilda, e
Sobretudo a *Deus* que, nunca, nunca, deixou de iluminar meus caminhos e de abrir-me os olhos, mesmo que de formas tão engraçadas.

À *minha família* que, mesmo à distância, transmitiu a compreensão, o apoio e o carinho de que tanto necessitei no decorrer deste Curso.

A meu amado *Gilson*, simplesmente e humildemente por tudo.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar o Curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Daison Olzany Silva, pela honra que me concedeu, ao aceitar orientar-me, pelas “conversas no fundão”, pelo carinho com que sempre me acolheu e pelo exemplo de compreensão e perseverança.

À Prof^a Maria Catarina Megumi Kasuya que, sempre, com seu “jeitinho”, promoveu valiosas discussões, transmitindo simpatia, conhecimento e atenção.

Ao Prof. José Mário da Silveira Mezêncio, pela constante ajuda na condução dos experimentos, pelos bons estímulos compartilhados e pela amizade desenvolvida.

Aos Prof. Eldo Antônio Monteiro da Silva e Kiyoshi Matsuoka, pelos conhecimentos transmitidos, pelas boas sugestões e discussões e pela atenção dispensada.

Ao Prof. Joaquim Patarroyo Salcedo, pela avaliação crítica, pela atenção ao estudo e pelas excelentes discussões.

Aos responsáveis pelos Laboratórios de Imunologia e Virologia, Micorriza, Anatomia Vegetal, Hematozoários, pela oportunidade de pelo uso, que viabilizou a execução dos experimentos.

Aos funcionários, Chiquinho e Monteiro, que, com suas brincadeiras, humanidade, humildade e conhecimentos, tornaram a parte de condução do experimento divertida e especial.

Aos funcionários Aline e Márcio, Nilcea, Aparecida, Rozane e Zilda, e aos demais funcionários, pelo auxílio e pela atenção demonstrados

A minha amiga Cristina Sayuri, pela confiança depositada, pelos constantes estímulos, pelos “enormes” e-mails e pelas boas recordações.

A Gabriel, Luzinete, Mara, Mariana e Taís, pela amizade, pela agradável convivência e pelos contínuos momentos de descontração.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, os mais sinceros agradecimentos, acrescidos da certeza transmitida pelas seguintes palavras de D. Hélder Câmara: *“As pessoas são pesadas demais para serem levadas nos ombros, leve-as no coração.”*

BIOGRAFIA

EXTRATO.....	viii
ABSTRACT.....	viii
CECÍLIA MIOKO YAMADA, filha de Hideo Yamada e Shizue Yamada, nasceu em Uraí-PR, em 13 de julho de 1971.	1
2. REV Em fevereiro de 1997, graduou-se em Biologia, pela Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina-PR.	3
2.2 Em março de 1997, iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG.	6
2.4. Localização e ocorrência de endofíticos.....	7
2.5. Microorganismos e qualidade da bebida do café	8
2.6. Microorganismos e estruturas internas de frutos de café.....	9
2.7. Técnicas para detecção de microorganismos endofíticos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Coleta dos frutos.....	14
3.2. Cortes histológicos a fresco.....	15
3.3. Inclusão em parafina.....	16
3.4. Aplicação de fluorocromos em cortes a fresco.....	17
3.5. Preparo das emulsões inamorgênicas.....	18
3.6. Imunização de coelhos.....	18
3.7. Procedimento para obtenção do antígeno solúvel.....	19

3.8. Ensaio para verificação de presença de anticorpos.....	20
3.8.1. Microaglutinação em gels.....	20
3.8.2. Imunoalifusão radial simples.....	21
3.8.3. Imunoalifusão dupla de Ouchterlony.....	22
3.8.4. Purificação de igg por método não cromatográfico.....	23
3.8.5. Contraimunoeletroforese.....	23
3.8.6. Coloração de bandas de precipitação.....	24
3.8.7. Imunodot-blot.....	25
3.8.8. Imunofluorescência.....	26
CONTEÚDO	
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Cortes histológicos de frutos de café.....	27
EXTRATO.....	.viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Origem e situação atual do café.....	3
2.2. A qualidade do café e de sua bebida.....	5
2.3. Conceito de microrganismos endofíticos.....	6
2.4. Localização e ocorrência de endofíticos.....	7
2.5. Microrganismos e qualidade da bebida do café.....	8
2.6. Microrganismos e estruturas internas de frutos de café.....	9
2.7. Técnicas para detecção de microrganismos endofíticos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Coleta dos frutos.....	14
3.2. Cortes histológicos a fresco.....	15
3.3. Inclusão em parafina.....	16
3.4. Aplicação de fluorocromo em cortes a fresco.....	17
3.5. Preparo das emulsões imunogênicas.....	18
3.6. Imunização de coelhos.....	18
3.7. Procedimento para obtenção do antígeno solúvel.....	19

3.8. Ensaio para verificação da presença de anticorpos.....	20
3.8.1. Microaglutinação em gota.....	20
3.8.2. Imunodifusão radial simples.....	21
3.8.3. Imunodifusão dupla de Ouchterlony.....	22
3.8.4. Purificação de igg por método não-cromatográfico.....	23
3.8.5. Contraimunoeletroforese.....	23
3.8.6. Coloração de bandas de precipitação.....	24
3.8.7. Imunodot-blot	25
3.8.8. Imunofluorescência indireta	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Cortes histológicos de frutos de café.....	27
4.2. Fluoresceína diacetato em cortes de frutos de café.....	33
4.3. Verificação da presença de anticorpos.....	35
4.3.1. Imunodot-blot	39
4.3.2. Imunofluorescência indireta	40
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
APÊNDICE	52

EXTRATO

YAMADA, Cecília Mioko, M.S. Universidade Federal de Viçosa, novembro de 1999. **Detecção de microrganismos endofíticos em frutos de café.** Orientador: Daison Olzany Silva. Conselheiros: Maria Catarina Megumi Kasuya e Eldo Antônio Monteiro da Silva.

A presença e a distribuição de bactérias e leveduras em frutos de café, desinfestados superficialmente, foram observadas, utilizando-se técnicas de microscopia com colorações biológicas e fluorocromo, inclusão em parafina e técnicas imunológicas. As preparações a fresco e de inclusão em parafina possibilitaram observar a existência de um gradiente de distribuição de bactérias e leveduras na polpa do café, com predomínio de leveduras em sua porção mais externa. Foram encontradas, também, bactérias nas sementes de café. A aplicação de fluoresceína diacetato, em cortes a fresco, não se mostrou eficiente, dada a dificuldade de visualização dos microrganismos *in situ* e a inespecificidade da reação. Os anticorpos específicos, para a bactéria *Klebsiella oxytoca*, foram obtidos; porém, a aplicação de imunofluorescência usando anticorpos como sonda, para detecção das bactérias, em tecidos de frutos de café, necessita de adaptações.

ABSTRACT

YAMADA, Cecília Mioko, M.S. Universidade Federal de Viçosa, November, 1999. **Detection of endophytic bacteria in coffee fruits.** Adviser: Daison Olzany Silva. Committee Members: Maria Catarina Megumi Kasuya and Eldo Antônio Monteiro da Silva.

The presence and distribution of bacteria and yeast in coffee beans disinfected superficially were observed microscopically with biological and fluorochromic dyes, permanent slides and immunological techniques. Fresh preparations and permanent slides permitted observation of the existence of a distribution gradient of bacteria and yeast within the coffee pulp, with a predominance of yeast in the outer portion. Bacteria were also found in the coffee seeds. Application of fluorescein diacetate in fresh cuts was not found efficient due to difficulty in visualizing the microorganisms *in situ* and the non specificity of the reaction. Specific antibodies for the bacteria *Klebsiella oxytoca* were obtained but the application of immunofluorescence using antibodies as probes for the detection of bacteria in coffee bean tissues requires further adaptations.

influenciar a qualidade da bebida. Assim, a inoculação de microrganismos favoráveis à melhoria da qualidade da bebida, em plantas de café, pode favorecer a produção de café de qualidade superior.

São escassas as informações sobre a importância desses microrganismos sobre a qualidade da bebida, e não há qualquer informação sobre a distribuição desses micróbios em frutos de café, nem sobre sua observação *in situ*.

Para observar os microrganismos endofíticos em frutos de *Coffea arabica*, este trabalho teve como objetivos: a) adequar técnicas de microscopia e imunológicas que possibilitem a observação *in situ*, e b) observar a sua distribuição nos tecidos internos desses frutos.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil sempre ocupou a posição de maior produtor e exportador de café no mundo. Porém, as safras brasileiras, que representavam de 70% a 80% das vendas mundiais de café, no início do século, caíram para aproximadamente 25%, em virtude, principalmente, da baixa qualidade do produto. Ainda assim, o país continua mantendo a posição de destaque no mercado internacional, influenciando a balança comercial.

A melhoria na qualidade do café brasileiro vem ocorrendo, não só pela exigência dos países consumidores, mas também para obtenção de preços melhores.

A qualidade do café pode ser influenciada por fatores como espécie, variedade, estágio de maturação, processos e microrganismos envolvidos na fermentação, além da presença de endofíticos.

São conhecidos como endofíticos, os microrganismos presentes no interior de tecidos vegetais, e cuja planta hospedeira não apresente sintomas aparentes.

A influência desses microrganismos, em tecidos saudáveis de frutos de café, auxilia o processo de fermentação natural, embora a fermentação inicial ocorra como resultado de enzimas naturais presentes nos frutos. Os produtos de hidrólise, resultantes da degradação de componentes específicos da polpa, podem

influenciar a qualidade da bebida. Assim, a inoculação de microrganismos favoráveis à melhoria da qualidade da bebida, em plântulas de café, pode favorecer à produção de café de qualidade superior.

São escassas as informações sobre a importância desses microrganismos sobre a qualidade da bebida, e não há qualquer informação sobre a distribuição dessa microbiota em frutos de café, bem como sua observação *in situ*.

Para observar os microrganismos endofíticos em frutos de *Coffea arabica*, este trabalho teve como objetivos: a) adequar técnicas de microscopia e imunológicas que possibilitem a observação de microrganismos *in situ*; e b) observar a sua distribuição nos tecidos internos desses frutos.

2.1. Origem e situação atual do café

O café é originário da Abissínia, atual Etiópia, sendo que a palavra "café" vem do árabe, *Qahwa* ou *Qahwa*, o excitante. As primeiras sementes foram introduzidas no Brasil, em 1727, trazidas da Guiana Francesa pelo sargento-mor Francisco de Melo Palheta (LEITE, 1998). Cultivado inicialmente nas províncias do norte do país, a produção da rubiácea só começou a se expandir a partir do momento em que se iniciou a plantação no Rio de Janeiro. O clima e as terras férteis transformaram o Brasil no maior produtor mundial do produto no final do século XIX. A partir daí, a cafeicultura deixou de ter um caráter essencialmente rural e passou a ser fonte de recursos para a urbanização e industrialização (TAGLIALEGMA, 1996). Ilustrações da rubiácea em moedas e laçadas demonstram bem sua influência na cultura brasileira. Hoje, a cultura de café é explorada comercialmente por cerca de 50 nações, em quatro dos cinco continentes, exceção feita à Europa em virtude dos fatores climáticos (LUCAS, 1985).

A produção e o consumo mundial de café estão em torno de 94 e 98 milhões de sacas, respectivamente (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ,

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem e situação atual do café

O café é originário da Abissínia, atual Etiópia, sendo que a palavra “café” vem do árabe, *Kahoua* ou *Qahwa*, o excitante. As primeiras sementes foram introduzidas no Brasil, em 1727, trazidas da Guiana Francesa pelo sargento-mor Francisco de Melo Palheta (LEITE, 1998). Cultivado inicialmente nas províncias do norte do país, a produção da rubiácea só começou a se expandir a partir do momento em que se iniciou a plantação no Rio de Janeiro. O clima e as terras férteis transformaram o Brasil no maior produtor mundial do produto no final do século XIX. A partir daí, a cafeicultura deixou de ter um caráter essencialmente rural e passou a ser fonte de recursos para a urbanização e industrialização (TAGLIALEGMA, 1996). Ilustrações da rubiácea em moedas e brasões demonstram bem sua influência na cultura brasileira. Hoje, a cultura de café é explorada comercialmente por cerca de 50 nações, em quatro dos cinco continentes, exceção feita à Europa em virtude dos fatores climáticos (LUCAS, 1986).

A produção e o consumo mundial de café estão em torno de 94 e 98 milhões de sacas, respectivamente (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ,

1997). O Brasil vem se destacando no mercado internacional como o maior produtor de café, contando com uma participação correspondente a 28% da produção mundial (Figura 1). O estado de Minas Gerais detém 38% da produção do café brasileiro e, junto aos estados de São Paulo, Espírito Santo e Paraná, concentra 88% da produção total do país (TAGLIALEGMA, 1996). Em 1997, somente o café teve uma participação de cerca de 6% sobre o total de todos os produtos exportados (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ, 1997). Em conseqüência, qualquer fator que venha, de alguma maneira, comprometer a produção e, ou, a produtividade do cafeeiro refletirá diretamente na balança comercial do país e nas disponibilidades internacionais.

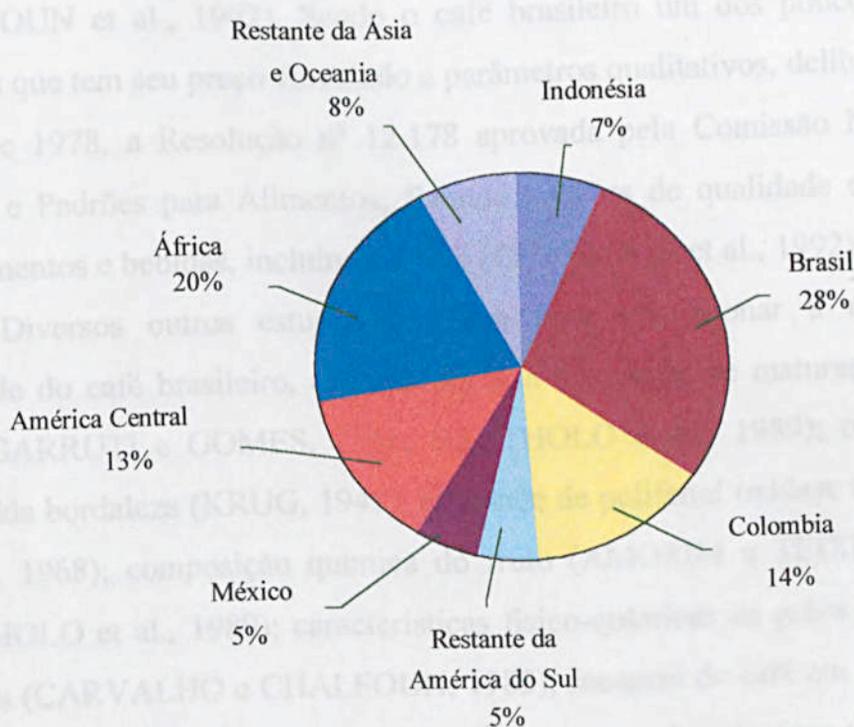


Figura 1 - Distribuição da produção mundial de café: média 1986 – 1995.

2.2. A Qualidade do café e de sua bebida

Apesar de ser o maior produtor e exportador mundial, o Brasil encontra-se com a qualidade do café superada pelos cafés do Quênia, da Etiópia e da Colômbia (BARTHOLO et al., 1989).

A qualidade do café é definida segundo as características dos grãos em relação a tipo (número de grãos imperfeitos ou impurezas/300g), cor (indica o grau de envelhecimento do café), peneira (baseia-se nas dimensões e forma dos grãos), aspecto (permite prever a boa ou má torração), gosto da bebida (consiste na “prova de xícara”). De acordo com esses tópicos, a bebida do café recebe classificações como sendo estritamente mole (gosto doce e muito suave), mole (doce suave), apenas mole (suave), duro (gosto áspero), riada (gosto leve de rio), rio (gosto áspero lembrando iodofórmio) ou rio zona (CHALFOUN et al., 1992).

Como a qualidade do café é o fator determinante de seu valor no momento da comercialização, tem-se verificado intensa pressão dos países consumidores, a fim de que a oferta de café de qualidade superior seja ampliada (CHALFOUN et al., 1992). Sendo o café brasileiro um dos poucos produtos agrícolas que tem seu preço vinculado a parâmetros qualitativos, deliberou-se, em março de 1978, a Resolução nº 12.178 aprovada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, fixando padrões de qualidade e identidade para alimentos e bebidas, incluindo o café (CHALFOUN et al., 1992).

Diversos outros estudos surgiram para impulsionar a melhoria na qualidade do café brasileiro, como influência do estado de maturação (KRUG, 1945; GARRUTI e GOMES, 1961; BARTHOLO et al., 1989); pulverizações com calda bordaleza (KRUG, 1945); atividade de polifenol oxidase (AMORIM e SILVA, 1968); composição química do fruto (AMORIM e TEIXEIRA, 1975; BARTHOLO et al., 1989); características físico-químicas de grãos beneficiados de cafés (CARVALHO e CHALFOUN, 1985); secagem do café em terreiro e em secador de leito fixo (CASTRO, 1991); lançamento de inúmeras variedades de sementes que representam pelo menos 90% do total de café plantado atualmente

no Brasil (FAZUOLI, 1999); e incidência de microrganismos (KRUG, 1945; BITANCOURT, 1957; ROUSSOS et al., 1995; SOUZA e CARVALHO, 1997).

2.3. Conceito de microrganismos endofíticos

Unger (1832), citado por PETRINI (1986), foi o primeiro a mencionar o termo endofíticos; porém, considerou ser uma expressão teratológica da própria planta e não o reconheceu como uma entidade separada. Essa definição levou os fitopatologistas a considerarem os microrganismos endofíticos como patógenos de plantas.

Como resultado de estudos sobre a relação simbiótica de fungos e bactérias em raízes de plantas superiores, o clássico conceito de que tecidos de plantas saudáveis são livres de microrganismos tem sido modificado (HOLLIS, 1951). Assim, diversos estudos têm sido realizados viabilizando entendimento da associação entre microrganismos e plantas, seja com os epifíticos, cuja colonização ocorre na superfície da planta, ou com os endofíticos.

Nessa última situação, o termo endofíticos tem recebido diversas definições, entre as quais menciona-se que microrganismos endofíticos são os que ocorrem naturalmente no interior dos tecidos vegetais e vivem em associação com a planta hospedeira (MENELEY e STANGHELLINI, 1974; BUGBEE et al., 1987). PETRINI (1986) propôs que a definição de microrganismos endofíticos fosse ampliada, incluindo todos os organismos que, habitando a parte externa dos órgãos da planta, fossem capazes de colonizar, em algum estágio do seu ciclo de vida, os tecidos internos dos vegetais, sem causar dano aparente à planta. Mais recentemente, HALLMANN et al. (1997) conceituaram bactérias endofíticas, como sendo aquelas bactérias isoladas ou extraídas de tecidos vegetais desinfestados superficialmente e que visivelmente não causam dano à planta.

2.4. Localização e ocorrência de endofíticos

De acordo com McINROY e KLOPPER (1995), o nicho interno de algumas plantas é explorado por uma ampla variedade de bactérias, as quais parecem estar localizadas, preferencialmente, na parte mais baixa do caule, com um gradiente em declínio que vai da base ao topo (CAMERON, 1970; FISHER et al., 1992). Isso sugere que a alta incidência de endofíticos não causa qualquer prejuízo fisiológico particular (CARROLL, 1995), e que as bactérias podem-se locomover de forma ascendente da raiz para o caule durante o desenvolvimento da planta (FISHER et al., 1992; GAGNÉ et al., 1987). Segundo a hipótese de SUNDIN et al. (1988), o movimento de bactérias endofíticas poderia ocorrer de forma semelhante ao movimento de translocação metabólica para a folha durante o outono.

A evidência visual sugere que alguns endofíticos ocupam domínios extremamente limitados dentro do tecido de plantas e podem, freqüentemente, estar confinados a uma única célula epidérmica, subsidiária ou hipodérmica (STONE, 1987). Também, SAMISH et al. (1962) reconhecem existir, em tecidos vegetais e frutos, um gradiente de densidade de populações bacterianas mais abundante, quando na periferia, a qual pode ser possivelmente indicativo da direção de entrada dos microrganismos.

TERVET e HOLLIS (1948) estudaram culturas de tomate, cenoura e beterraba assintomáticas e revelaram a presença de bactérias endofíticas com formas semelhantes a clostrídios e bastonetes Gram negativos.

Há, na literatura, uma diversidade de bactérias endofíticas isoladas de uma ampla variedade de espécies de plantas como batata (HOLLIS, 1951, DE BOER e COPEMAN, 1974), tomate (SAMISH et al., 1962), pepino (SAMISH et al., 1962; MENELEY e STANGHELLINI, 1974), citrus (GARDNER et al., 1982), alfafa (GAGNÉ et al., 1987), beterraba (BUGBEE et al., 1987), algodão (MISAGHI e DONNDELINGER, 1990), pêra (WHITESIDES e SPOTTS, 1991), milho (FISHER et al., 1992), uva (BELL et al., 1995) e polpa de café (TAUK, 1984; ROUSSOS et al., 1995; JIMENEZ-SALGADO et al., 1997). Vem sendo

relatada, também, a presença dessa microbiota, em diferentes tecidos vegetais, comumente encontrados em raízes e, mais raramente, em xilema (GARDNER et al., 1982) e em sementes e óvulos (MUNDT e HINKLE, 1976; McINROY e KLOEPPER, 1995).

2.5. Microrganismos e qualidade da bebida do café

Os primeiros trabalhos publicados, correlacionando a incidência de microrganismos que afetam a qualidade da bebida do café, datam de 1936, quando foi detectada a presença do micélio de *Fusarium*, em grãos de café, prejudicando a qualidade da bebida (KRUG, 1940a).

Partindo da hipótese de serem os microrganismos os responsáveis pela origem dos cafés duros, KRUG (1940b) observou a presença de fungos e bactérias em 21% de cafés secos no chão, e ausência desses microrganismos em frutos cereja, associando a má qualidade da bebida à maior permanência dos frutos no chão e, conseqüentemente, à maior incidência de fungos.

Ainda estudando a relação entre microrganismos e qualidade da bebida do café, KRUG (1941) verificou que de um ataque mais intenso de certos microrganismos, obtém-se uma bebida pior. Assim, para o grupo de bebida “mole”, de um total de 9,28% de frutos com microrganismos, 3,38% eram *Fusarium*, como, também, para o grupo de bebida “rio”, dos 54,5% dos frutos colonizados por microrganismos, 34,5% eram *Fusarium*.

BITANCOURT (1957) realizou isolamentos de microrganismos em cafés cereja em diferentes fases do preparo, no cafezal e no terreiro de secagem, observando uma abundância de certos fungos e diversas bactérias, verificando, ainda, a presença de leveduras, um grupo diferenciado de microrganismos, as quais foram reunidas sob o nome de *Torula* spp, com ocorrência de 55% nos frutos do café seco no terreiro. Resultado semelhante foi obtido por ROUSSOS et al. (1995).

Uma das primeiras explicações sobre um dentre os vários fenômenos que afetam a qualidade da bebida foi proposta por MÔNACO (1961), o qual relata que o gosto de cebola da bebida advém de um produto da fermentação, o ácido propiônico. A quantidade desse produto depende dos microrganismos presentes no café, descartando, assim, as condições de cultivo, a altitude, o clima ou a colheita como promotores do indesejável gosto de cebola do café, após a infusão. Entretanto, os agentes responsáveis pela transformação continuam desconhecidos, pois várias são as espécies de leveduras, fungos e bactérias introduzidas no tanque de fermentação, pela água e pelo café despulpado (MEIRELLES, 1990).

As bactérias isoladas de cafés fermentados foram descritas como pectinolíticas, gram-negativas, não-formadoras de esporos e fermentadoras de lactose (Frank e Dela Cruz, 1964; Frank et al., 1965, citados por ARUNGA, 1982). Entretanto, em amostras de café cereja da variedade Bourbon, foram também encontrados fungos pectinolíticos e leveduras (MENCHÚ e ROLZ, 1973).

TAUK (1984) encontrou maior número de bactérias e leveduras na parte central do tecido da polpa fresca do café, enquanto fungos miceliais somente foram detectados quando a polpa estava em fase mais avançada de decomposição, indicando que ocorreu uma sucessão na comunidade de microrganismos. Esse autor ainda sugere que a presença de bactérias e leveduras na polpa fresca seja decorrente da sua preferência por açúcares e compostos menos complexos para seu desenvolvimento, enquanto o surgimento posterior de fungos e actinomicetos seja decorrente de sua capacidade de usar compostos intermediários ou mais complexos como celulose, quitina e lignina.

2.6. Microrganismos e estruturas internas de frutos de café

A alta concentração de açúcares, a presença de substâncias pécticas juntamente com o teor de umidade elevado da polpa constituem fontes de

fermentações, propiciando condições excelentes para o desenvolvimento microbiológico em frutos de café (LEITE, 1998), conduzindo a hipótese de que microrganismos pectinolíticos podem ter significado particular na fermentação do café (ARUNGA, 1982).

A maturação do café inicia-se com o aumento da atividade respiratória e com a síntese do etileno, proporcionando o metabolismo de açúcares e ácidos, a degradação da clorofila e a síntese de pigmentos responsáveis pela mudança da coloração da casca, que passa do verde à coloração vermelho cereja, além do decréscimo de adstringência e a síntese de substâncias voláteis como aldeídos, estéres, cetonas e alcóois, que caracterizam o aroma do fruto maduro (CARVALHO e CHALFOUN, 1985).

Durante a secagem, essa polpa do café natural é digerida e liquidificada, constituindo material alimentar para a semente, propiciando uma continuação do seu metabolismo e da respiração. Essas mudanças químicas modificam o sabor do café. Uma diversidade de microrganismos, tais como leveduras, fungos e bactérias, encontrando condições favoráveis para desenvolvimento, produzem suas próprias enzimas, que agem sobre os componentes químicos da polpa, principalmente sobre os açúcares, fermentando-os e produzindo álcool. Este é desdobrado em ácido acético, láctico e butírico e em outros ácidos carboxílicos superiores. Ao se iniciar a produção de ácido butírico, começa a haver prejuízo na qualidade do café (CARVALHO e CHALFOUN, 1985).

Vários pesquisadores vêm mostrando, repetidamente, que o desarranjo da polpa, durante a fermentação inicial, ocorre como resultado da atividade de enzimas naturais do café cereja, mas que os principais fatores em fermentações naturais são as enzimas extracelulares, elaboradas por microrganismos (CARVALHO e CHALFOUN, 1985). Outro fator que contribui para confirmar a presença de enzimas, em alguma fase do desenvolvimento do fruto, são as medições de pH, uma vez que sementes de café não-fermentado apresentaram pH entre 5,4 e 6,4 e, durante a fermentação, ocorreu um decréscimo do pH para 3,7, em estudos realizados por MENCHÚ e ROLZ (1973).

A complexidade do processo de fermentação desafia qualquer firme conclusão sobre microrganismos específicos responsáveis por todo o fenômeno. É mais provável que vários microrganismos contribuem com suas enzimas, as quais degradam componentes específicos da polpa (ARUNGA, 1982).

A casca, o pergaminho e as películas do café funcionam como proteção (LEITE, 1998) e, provavelmente, a transposição da barreira, presente em sementes e óvulos, ocorre durante a germinação e o desenvolvimento da radícula, uma vez que cerca de 90% das plântulas pesquisadas já possuíam bactérias no xilema, estabelecendo, então, a presença de endofíticos anterior à germinação (McINROY e KLOEPPER, 1995).

De acordo com MUNDT e HINKLE (1976), as bactérias individuais atravessam as barreiras mecânicas da planta, resistem aos mecanismos protetores vitais, que normalmente funcionam para prevenir o parasitismo bacteriano, e são levados e depositados dentro do óvulo. Porém, quando esse rompimento do óvulo e de alguns dos cascos duros da semente torna-se mais difícil, podem ser encontradas bactérias entre o casco da semente e o cotilédone (MUNDT e HINKLE, 1976).

2.7. Técnicas para detecção de microrganismos endofíticos

Como os endofíticos não causam alterações fenotipicamente observáveis, a detecção de sua presença dentro do tecido hospedeiro, não pode ser realizada de maneira causal. Segundo REINHOLD-HUREK e HUREK (1998) para se comprovar que uma determinada bactéria é capaz de colonizar endofiticamente espécies vegetais, devem ser realizados estudos microscópicos. Esses estudos devem seguir alguns critérios: a) deve-se prevenir que bactérias da superfície do órgão vegetal contaminem o interior dos tecidos, durante a preparação dos cortes histológicos; e b) as bactérias visíveis no tecido vegetal, especialmente de plantas cultivadas em solo não-estéril, devem ser identificadas *in situ*, imunologicamente, através de sondas gênicas específicas ou através de genes repórter.

GARDNER et al. (1982), após isolar 30 gêneros de bactérias provenientes do xilema de raiz de limão, utilizaram soluções aquosas de fucsina ácida 0,1% e de vermelho Congo 0,1%, infiltradas a vácuo, dentro de segmentos de raiz de limão, e procederam aos cortes para observação das áreas coradas, verificando, assim, de quais tecidos procedeu o xilema extraído contendo as bactérias.

A coloração com o corante cristal violeta, para a observação de bactérias endofíticas em seiva de folha de pimenta, também tem sido mencionada como eficiente, pois resultados similares foram observados para os anticorpos específicos conjugados com FITC, os quais interagiram com as bactérias (MORTON, 1964).

STONE (1987) procedeu a desinfestação superficial de ramos de pinheiro de Douglas, seguida da coloração com azul de Tripán 0,05% em lactofenol e aplicou a técnica de desidratação, por meio de série etílica progressiva, seguindo-se aplicação de xilol-etanol e trocas de xilol e montagem em lâminas de vidro com Permout, para estimar a freqüência e a infecção do fungo endofítico.

A produção de anticorpos para bactérias extraídas de tecidos vegetais tem permitido a utilização desses, como sonda em procedimentos de imunofluorescência, possibilitando, com isso, a detecção específica de bactérias e confirmação da colonização *in situ*. A precisão dessa técnica pode ser melhorada, aumentando-se a concentração bacteriana em uma amostra, ou amplificando-se a reação do anticorpo (KLOEPPER e BEAUCHAMP, 1992), com auxílio da liofilização.

Uma das mais importantes considerações no uso de técnicas imunofluorescentes, para a identificação de microrganismos, é a possibilidade de anticorpos produzirem reação cruzada com determinantes antigênicos de outras bactérias (DE BOER e McNAUGHTON, 1986), somando-se o fato da fluorescência do tecido vegetal ser comum (HOOD e SHEW, 1996). Esses fatores têm limitado a observação *in situ*.

Entre os procedimentos aplicados à detecção e identificação de bactérias endofíticas, em sistemas de plantas, encontra-se a produção de anticorpos policlonais contra essa microbiota e conjugação com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (MORTON, 1964) e peroxidase (SCHLOTTER et al., 1997), podendo a quantificação do endofítico ser efetuada pela técnica ELISA (SCHLOTTER et al., 1997).

Como métodos adicionais de detecção da presença do antígeno, citam-se a imunodifusão dupla de Ouchterlony, que possibilita uma rápida avaliação de tecidos vegetais, embora não seja visto como um teste exclusivo para determinação final (SCHAAD, 1976; MALIN et al., 1983) e imunodot-blot (DRACZ, 1996). O procedimento de sonicação das suspensões de antígenos para facilitar o movimento deste, através do ágar, também tem sido relatado (MALIN et al., 1983).

Uma razão da limitada aplicação de anticorpos tem sido o rápido desenvolvimento de sondas moleculares com base na seqüência de DNA e sua utilização crescente na detecção de bactérias associadas a tecidos vegetais (DE BOER e WARD, 1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos frutos

Foram coletados frutos de café *Coffea arabica* L. cv. Catuaí vermelho, nos estádios de maturação verde e cereja de cafeeiros existentes na coleção da seção de café, na Estação Experimental do campus da Universidade Federal de Viçosa. Também foram coletados os frutos de café *C. arabica* da variedade IAPAR 59, provenientes da região de Londrina-PR., os quais foram utilizados para fins de comparação da existência ou não de microrganismos.

Periodicamente, os frutos foram coletados com auxílio de instrumento cortante, retirando-se o fruto com parte do pedúnculo, para evitar ferimentos que poderiam constituir via de entrada de microrganismos. As amostras foram separadas, de acordo com o estádio de maturação, em sacos de polietileno e, após desinfestação superficial, foram conservadas em geladeira, por no máximo três dias.

Sendo a produção dos frutos sazonal, após a coleta e desinfestação superficial, alguns frutos foram estocados a -20°C , permitindo, assim, sua adequada conservação e a continuidade do estudo.

3.2. Cortes histológicos a fresco

Os frutos coletados foram desinfestados superficialmente pela lavagem com solução detergente, enxágüe com água destilada estéril, imersão rápida em solução de álcool 70%, novo enxágüe com água destilada estéril e manutenção em água oxigenada 5V por dois minutos (VIANA et al., 1997) e, posteriormente, enxágüe com água destilada estéril.

Após esse procedimento, os tecidos de frutos frescos foram seccionados transversal e longitudinalmente em criomicrotomo (Leica CM 1850), com espessura de corte de 10 a 20 μm . Foi aplicado solução de goma arábica como suporte do fruto no criomicrotomo. A cada corte de um novo fruto, a navalha do criomicrotomo foi desinfestada com álcool 70%.

Para se prevenir a ocorrência de artefatos de técnica, cuidadosas lavagens dos cortes foram efetuadas para remoção do material particulado aderido aos cortes (WACHSTEIN e MEISEL, 1953). E, em outros casos, os cortes foram imediatamente transferidos para lâminas de vidro (7,5 x 2,5 x 0,17 cm).

Sobre esses cortes, foram aplicados os corantes biológicos Giemsa, safranina aquosa, cristal violeta e azul de toluidina, com os tempos de 0,5, 1 e 2 min. Para fins de comparação, foram preparadas lâminas, a partir de culturas axênicas de leveduras e *Klebsiella oxytoca*, isoladas de frutos de café (VIANA et al., 1997), utilizando-se os mesmos corantes.

Utilizou-se também a técnica de coloração diferencial de Gram, que consistiu em imersões sucessivas do corte em solução de cristal violeta, por um minuto, lugol (mordente) pelo mesmo tempo, solução de HCl 1N (agente descolorante) por 25 segundos e, por último, solução de fuccina (contra-corante) por um minuto. Entre cada etapa, o material foi lavado em água destilada.

Após as colorações, as secções foram observadas com ocular de 40 e 100 vezes de aumento em microscópio de campo claro de transmissão Jenaval / Zeiss, e fotomicrografadas.

3.3. Inclusão em parafina

Após a etapa de desinfestação superficial, os frutos de café foram emblocados em parafina.

De início, fez-se a fixação do material em FAA (formalina/acetato glacial/etanol 50%), durante 48 horas, para fixação da estrutura vegetal. Foi empregado bomba de vácuo durante esse processo, para eliminação de bolhas de ar em fissuras do tecido vegetal (HALLAS, 1976), que ocorrem durante trocas do último banho de xilol e da primeira parafina, durante embebição, dificultando infiltração da parafina no tecido.

Posteriormente, efetuou-se desidratação seqüencial em uma série de álcool etílico 60%, 70%, 80% e 90%, seguindo-se uma série de etanol-butírico 2:1, 1:1 e 1:2, e um intervalo de quatro horas entre cada troca (SASS, 1958).

Em seguida, procedeu-se a infiltração, embebição e emblocamento do material em parafina, passando, a seguir, à estufa, à temperatura controlada para 60°C (JOHANSEN, 1940). Nessa etapa, a amostra foi mantida imersa em álcool butírico puro por 1 hora, e em álcool butírico puro e parafina (1:1) durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após esse tempo, levou-se o material para estufa, a 60°C, por quatro horas. Realizaram-se, então, duas trocas de parafina líquida pura, onde se manteve cada banho de parafina em estufa a 60°C, por duas horas. O material foi mergulhado em parafina e cera de abelha 10%, e, em seguida, foram montados os bloquinhos de parafina.

Os cortes transversais dos materiais, na espessura entre 10 e 20 μm , foram feitos em micrótomo rotativo (Spencer modelo 820), o qual permitiu a obtenção de cortes sucessivos numa ordem seqüencial. Esses cortes foram dispostos sobre lâmina de vidro com adesivo de Haupt (JENSEN, 1962). Sobre a lâmina, foi adicionada uma gota de água e, então, foram transferidas as fitas de parafina com os cortes. A fita foi distendida, colocando-se as lâminas sobre placa quente a 40 - 45°C, evitando-se, assim, enrugamento durante a etapa de coloração (JOHANSEN, 1940).

O processo de desparafinização foi efetuado após 24 horas, imergindo-se as lâminas com os cortes em xilol 100%, xilol e álcool 100% (1:1), álcool 100%, 90%, 80%, 70% e 60%, cada qual com tempo de espera de 10 min.

Para o processo de coloração, adicionou-se safranina de Johansen, mantendo-se um tempo de reação de uma hora. Posteriormente, utilizou-se álcool 50%, 60%, 70%, 80% e 90%, "fast green", álcool absoluto, xilol e álcool absoluto (1:3), xilol e álcool absoluto (1:1), xilol e álcool absoluto (3:1) e duas imersões em xilol. Foi empregado, para cada reação, um tempo de cinco minutos.

À lâmina com o corte, foi adicionado bálsamo de Canadá e coberta com lamínula e mantida em chapa quente a 35°C até a secagem (JOHANSEN, 1940).

3.4. Aplicação de fluorocromo em cortes a fresco

Fluoresceína diacetato (3,6-diacetil fluoresceína) a 0,2% em acetona, alternativa de coloração testada, a qual, após ser desesterificada dentro de célula ativa, resultou em fluoresceína polar facilmente visualizada em microscópio de fluorescência (OPARKA e READ, 1994).

Foram preparadas lâminas a partir de culturas axênicas de *K. oxytoca* e de leveduras; lâminas com *K. oxytoca* e fluoresceína diacetato; leveduras e fluoresceína diacetato: corte do fruto de café e corte do fruto de café com fluoresceína diacetato.

Após a confecção, as lâminas foram incubadas por duas horas, à temperatura ambiente, no escuro, observadas com objetiva de 40 e 100 vezes de aumento, tanto em microscópio de campo claro como em fotomicroscópio de epifluorescência (Olympus BX 60), com filtro de excitação de 450 - 480 nm (CMA₃ quinacrina) e fotomicrografadas.

3.5. Preparo das emulsões imunogênicas

Três formas do imunógeno *K. oxytoca* foram inoculadas, em diferentes coelhos, como descrito a seguir:

a) Imunógeno íntegro I:

As bactérias *K. oxytoca* foram crescidas em caldo nutriente por 15 horas, à temperatura ambiente. Ao fim desse tempo, fez-se a centrifugação a 5.000 rpm, por 10 min, e ressuspensão em solução salina 0,85%. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. Após esta lavagem do sedimento de bactérias, foram adicionados 300 mL de solução salina 0,85%, igual ao volume inicial de caldo nutriente.

b) Imunógeno íntegro II:

A bactéria *K. oxytoca* foi crescida em placa com ágar nutriente, por 24 horas, à temperatura ambiente. Fez-se um acréscimo de 10 mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,35, estéril, e raspagem do meio com auxílio de alça de Drigalski.

c) Imunógeno rompido:

A suspensão de *K. oxytoca* crescida em 1.000 mL de caldo nutriente foi centrifugada a 5.000 rpm, por 10 min, e ressuspensas em 2,0 mL de solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,35. Essa solução foi adicionada até completar um volume final de 35 mL. Posteriormente, as células foram pressurizadas (French Pressure Press Cell) e as células rompidas foram coletadas em recipientes e mantidas em banho de gelo, sendo conservadas a -20°C .

3.6. Imunização de coelhos

Antecedendo à imunização dos animais, foi coletado o sangue dos coelhos (soro) através de uma pequena incisão longitudinal na veia marginal da

orelha. O sangue foi mantido à temperatura ambiente, por duas horas, e, em seguida, em geladeira, por aproximadamente três horas, sendo o soro coletado e centrifugado a 5.000 rpm, por cinco minutos e congelado a -20°C .

Os três coelhos escolhidos para imunização foram machos, brancos, da raça Nova Zelândia, com aproximadamente três meses de idade, os quais foram mantidos isolados e alimentados apropriadamente. Foram submetidos a imunização por via intramuscular na pata e, ou, subcutânea, cada qual consistindo na aplicação de adjuvante incompleto de Freund e solução salina 0,85% contendo os imunógenos (1:1). Para as inoculações intravenosas, o imunógeno foi inoculado na veia marginal da orelha do animal, sem uso de adjuvante. Foi mantido um intervalo de 15 dias entre cada aplicação. Ao final das quatro primeiras inoculações, foram aplicadas doses de reforço da emulsão, via subcutânea, seguindo-se o mesmo intervalo de tempo entre as aplicações (DRACZ, 1996). Os antissoros foram coletados sete a doze dias após cada imunização.

Outra espécie de animal imunizado, para avaliação da resposta imunológica contra *K. oxytoca*, foi o camundongo. Nessa etapa, foram utilizados cinco camundongos, cuja via de imunização foi a intraperitoneal, e aplicada alíquota de 0,1 mL, retirada da emulsão adjuvante incompleto de Freund 1:1 e solução salina 0,85% contendo o imunógeno. Decorridos sete dias, foi inoculado o tumor de Hellich. Após quinze dias da imunização, recolheu-se o líquido ascítico, para observação da resposta imunológica.

3.7. Procedimento para obtenção do antígeno solúvel

A suspensão de células de *K. oxytoca* (item 3.5.b.) foram aquecidas à temperatura de ebulição da água por uma hora. O material foi centrifugado e o sobrenadante conservado a -20°C (MEZÊNCIO, 1981). Esse mesmo procedimento foi feito para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV), que foi utilizada como controle positivo. Essa bactéria foi escolhida em função de ser

um fitopatogênico isolado de plantas, da facilidade de acesso ao material e do conhecimento do bom título de seu antissoro.

Em situações em que as bactérias foram crescidas em caldo nutriente à temperatura ambiente, por aproximadamente 24 horas, foram feitas três lavagens consecutivas do sedimento com solução salina 0,85% e centrifugação a 5.000 rpm, por 10 min. A massa celular foi, então, ressuspensa em solução tampão fosfato 0,1M, pH 7,35, e submetida à solubilização por fervura, como acima descrito.

Em algumas fases do experimento, trabalhou-se com o antígeno solúvel, obtido por fervura, e sonificado. O processo de sonicação foi realizado a 4°C, com frequência constante e amplitude de 40 a 60 watts (Labsonic System). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min e o sobrenadante coletado e conservado a -20°C.

3.8. Ensaios para verificação da presença de anticorpos

3.8.1 Microaglutinação em gota

Para a diluição do antissoro anti (α) *K. oxytoca*, utilizou-se uma microplaca contendo 96 orifícios. A cada um dos 12 orifícios de uma linha foram adicionados 50 μ L de solução salina 0,85%. No primeiro orifício, foram adicionados 50 μ L do antissoro. Após homogeneização, 50 μ L do conteúdo do primeiro orifício foram transferidos para o seguinte, repetindo-se esse procedimento até o último orifício. O processo foi repetido para cada antissoro. Uma placa de Petri com o fundo revestido por uma fina camada de 0,3% de Formvar em clorofórmio, foi dividida em 16 quadrados de tamanhos iguais (Figura 2) (MEZÊNCIO, 1981).

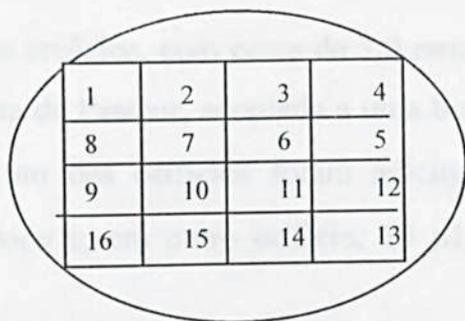


Figura 2 – Esquema da distribuição das posições em placa de Petri, para realização da microaglutinação em gota.

Cada diluição do antissoro foi transferida para a sua respectiva posição na placa de Petri enumerada. O antissoro não-diluído foi transferido para as posições 13 e 14. Em seguida, foi adicionada a solução de antígeno *K. oxytoca*, em todas as posições, exceto para a posição 14, na qual foi adicionada, igualmente para a posição 15, solução salina 0,85%.

Após três horas de reação, em temperatura ambiente, foi observada sob lupa, a mudança de intensidade das malhas de precipitação ou aglutinação, de acordo com a variação das diluições do antissoro. Para determinação dos títulos de aglutinação, utilizou-se o inverso da diluição obtida na placa de Petri em que houve reação.

3.8.2 Imunodifusão radial simples

Nessa técnica, um dos reagentes, o antígeno *K. oxytoca* solúvel (item 3.7) ou o anticorpo α *K. oxytoca*, foi incorporado ao ágar fundente. Alíquota de 1,0 mL do antígeno *K. oxytoca* solúvel foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de ágar fundente em tampão salina borato pH 8,4 – 8,5. Essa mistura foi vertida em placa de Petri ou em lâminas de vidro (5 x 7 x 0,2cm), previamente recobertas por uma fina camada de ágar-água 0,1%. O sistema foi mantido em geladeira até a solidificação (MEZÊNCIO, 1981).

Foram feitos orifícios, com cerca de 3,0 mm de diâmetro, no gel. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acoplada a uma bomba de vácuo, foi retirado o gel seccionado. A um dos orifícios foram adicionados 10 μ L do respectivo antissoro α *K. oxytoca* e, em outro orifício, 10 μ L da XCV solúvel (controle positivo).

A placa foi incubada à temperatura ambiente por 8 a 12 horas. Após esse período, observou-se presença ou não de um halo formado em torno dos orifícios.

3.8.3 Imunodifusão dupla de Ouchterlony

Sobre placa de Petri ou em lâminas histológicas de vidro (5 x 7 x 0,2 cm), previamente recobertas por uma fina camada de ágar - água a 0,1%, verteu-se o ágar em tampão salina borato pH 8,3.

Após a solidificação do gel, foram feitos orifícios de 3,0 mm de diâmetro, em forma de roseta, distanciados 5,0 mm entre os orifícios. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acoplada a uma bomba de vácuo, foi retirado o gel seccionado.

Ao orifício central, foram adicionados 10 μ L de antígeno solúvel não-diluído. Nos orifícios periféricos, foram adicionados 10 μ L dos antissoros diluídos (item 3.8.1), respeitando-se a ordem crescente de diluição (OUCHTERLONY, 1968).

Para verificar se a solução de antígeno poderia conter partículas de peso molecular maior, que poderia estar interferindo na reação, a solução de antígeno solúvel foi centrifugada a 5.000 e a 10.000 rpm, por cinco minutos. Esses dois sobrenadantes foram postos a reagir com o antissoro α *K. oxytoca* e, posteriormente, foi observada a reação.

A verificação da presença ou não de bandas de precipitação foi feita 8 a 12 horas após a incubação à temperatura ambiente.

Utilizou-se XCV e seu respectivo antissoro como controle positivo.

3.8.4 Purificação de IgG por método não-cromatográfico

Preparou-se o antissoro α *K. oxytoca* na concentração de 20% em tampão acetato 60mM pH 4,0, corrigindo-se o pH da solução para 4,5, com NaOH 0,1N. A essa solução, adicionou-se, lentamente, ácido caprílico na proporção de 25 μ L/mL de amostra diluída. Após 30 min de agitação constante, fez-se a centrifugação a 11.000 rpm, por 30 min.

O sobrenadante foi filtrado e, a cada volume deste, misturaram-se nove volumes de tampão salina fosfato 10x. O pH foi ajustado para 7,4 com solução de NaOH 1N e refrigerado a 4°C. Os passos subseqüentes foram todos executados a 4°C.

Adicionou-se sulfato de amônio (0,277 g para cada mL de sobrenadante), com subseqüente agitação por 30 min e centrifugação a 5.500 rpm, por 40 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido, na proporção de 10 volumes do volume inicial do antissoro, para 1 volume do tampão salina fosfato diluído 1/10.

A diálise da amostra foi feita por 24 horas, em PBS diluído 1/10, sendo feita uma troca da solução após, aproximadamente, 10 horas de diálise.

O material dialisado foi transferido para um tubo de ensaio e aquecido a 50-55°C, em banho-maria, por 20 min. Posteriormente, fez-se a centrifugação a 5.500 rpm, por 20 min, e o sobrenadante foi armazenado a -20°C (McKNNEY e PARKINSON, 1987).

Como controle positivo da técnica, utilizou-se XCV e seu respectivo antissoro.

3.8.5 Contraimunoeletroforese

Uma das superfícies de uma lâmina de vidro (5 x 7 x 0,2 cm) foi previamente coberta com uma fina camada de ágar - água 0,1%. Adicionou-se,

lentamente à lâmina, ágar nobre 0,7% em tampão de corrida pH 8,6, de modo que se formasse uma camada de 1,0 mm de espessura. Após solidificação do gel, foram feitas duas fileiras de orifícios de 3,0 mm de diâmetro. O espaçamento utilizado foi de 0,4 cm entre as cavidades, e 1,0 cm entre as fileiras (DRACZ, 1996).

A cada orifício, foram adicionados 10 µL do antissoro α *K. oxytoca* disposto no ânodo (pólo positivo). No cátodo (pólo negativo), foram adicionados 10 µL do antígeno *K. oxytoca* solúvel. Ambos os reagentes foram posicionados em um mesmo eixo.

As lâminas foram colocadas em aparelho de eletroforese horizontal com tampão de corrida pH 8,6, utilizando-se papel-filtro com uma única camada. A corrida eletroforética foi realizada à temperatura ambiente, durante duas horas, (Bio-Rad Pac 3.000) e corrente de 10 mA. Ao fim dessa corrida, foi observada a presença ou não de bandas de precipitação entre os orifícios.

Foi utilizado XCV e seu respectivo antissoro como controle positivo.

3.8.6 Coloração de bandas de precipitação

Para coloração e melhor visualização das bandas de precipitação formadas na imunodifusão dupla e na contraímunoeletroforese, foi realizada a coloração por azul de Coomassie G-250 (DRACZ, 1996).

Foi colocado um papel-filtro sobre a lâmina a ser corada e, sobre este, uma camada de aproximadamente 2,0 cm de espessura de papel-filtro, prensando-se a lâmina com uma carga de aproximadamente 1,0 kg, durante 10 min. Decorrido esse tempo, o gel foi secado com ar quente. A lâmina foi imersa em uma solução de NaCl 0,1N, durante 15 min, para a retirada de proteínas não-precipitadas. Repetiu-se esse procedimento por mais duas vezes. Imergiu-se a lâmina em água destilada por 15 min. Em seguida, foi feita nova prensagem e secagem da lâmina, como descrito anteriormente. Colocou-se a lâmina em solução corante de azul de Coomassie G-250, durante 10 min. A descoloração foi

feita em solução de igual composição a do corante, porém, sem o azul de Coomassie. Após essa etapa, somente as bandas de precipitação formadas permanecem coloridas de azul.

3.8.7 Imunodot-blot

A produção de anticorpo específico foi também verificada por “imunodot-blot”, utilizando-se membrana de nitrocelulose e IgG de cabra α coelho conjugada com peroxidase (DRACZ, 1996).

Uma alíquota de 2 μ L da solução de bactérias *K. oxytoca* solúveis e não-diluídas e diluídas 1/2 foram homogeneizadas com tampão carbonato bicarbonato 0,2M, pH 9,6, na proporção de 1:1, e adsorvida em membrana de nitrocelulose, e posta a secar à temperatura ambiente.

Após a secagem, a membrana foi lavada sob agitação constante, por 10 min, em 200 μ L de tampão salina fosfato pH 7,4 contendo Tween 20 (PBST). Essa etapa foi repetida por mais duas vezes. A cada troca, a solução de PBST foi aspirada com bomba à vácuo. Foram feitas lavagens da membrana, como anteriormente descrito.

Foram adicionados 50 μ L de antissoro α *K. oxytoca* não-diluído e nas diluições de 1/4, 1/16, 1/64 e 1/128, em PBST, mantendo-se por uma hora sob agitação constante. Fez-se nova lavagem da membrana, como anteriormente descrito.

Alíquota de 100 μ L de IgG de cabra α coelho conjugada com peroxidase, em diferentes diluições, em PBST, foi submetida a agitação constante, por uma hora, e efetuou-se uma última lavagem.

Utilizando-se agitação constante, foram adicionados 150 μ L de solução de diamino benzidina, preparada somente no momento do uso, com tempo de reação de 10 min. Ao término desse intervalo, a reação foi interrompida com adição de água destilada, que foi aspirada posteriormente com uso de bomba a vácuo, sendo observada, a olho nu, a formação ou não de um produto de

coloração marrom, o qual precipita no sítio de reação, em virtude da reação da enzima com o substrato solúvel.

Utilizou-se XCV e seu respectivo antissoro, como controle positivo da técnica. Avaliou-se esse antígeno não-diluído, diluído 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32, com seu respectivo antissoro não-diluído, diluídos 1/2, 1/4, 1/8, 1/10, 1/16, 1/20, 1/32.

3.8.8 Imunofluorescência indireta

Preparou-se esfregaço com culturas axênicas de XCV e de *K. oxytoca*, sendo este último antígeno utilizado, quando em solução salina 0,85% e quando em caldo nutriente; e na sua forma solúvel e solúvel e sonicada.

As lâminas foram fixadas com metanol por cinco minutos, lavadas com tampão PBS e secadas à temperatura ambiente ou em câmara secadora de gel.

Foram adicionados, a cada lâmina contendo células de *K. oxytoca*, o soro (controle negativo), o antissoro α *K. oxytoca* e o antissoro liofilizado. Adicionou-se à lâmina com XCV o antissoro α *K. oxytoca*. Procedeu-se a incubação das lâminas, em câmara úmida em banho-maria, a 37°C, por 45 min. Após esse período, fez-se nova lavagem e secagem das lâminas, como já descrito (OLIVEIRA, 1998).

Foi adicionado IgG de cabra α IgG de coelho conjugado com FITC nas diluições de 1/128, 1/40 e 1/10, com PBS, e fez-se a incubação em câmara úmida em banho-maria, a 37°C, por 45 min, no escuro. Repetiu-se a etapa de lavagem e de secagem das lâminas.

O contra-corante, azul de Evans, foi adicionado às lâminas e mantido por três minutos, com posterior lavagem em água destilada. A observação foi feita em fotomicroscópio de epifluorescência, com filtro de excitação de 450-480 nm.

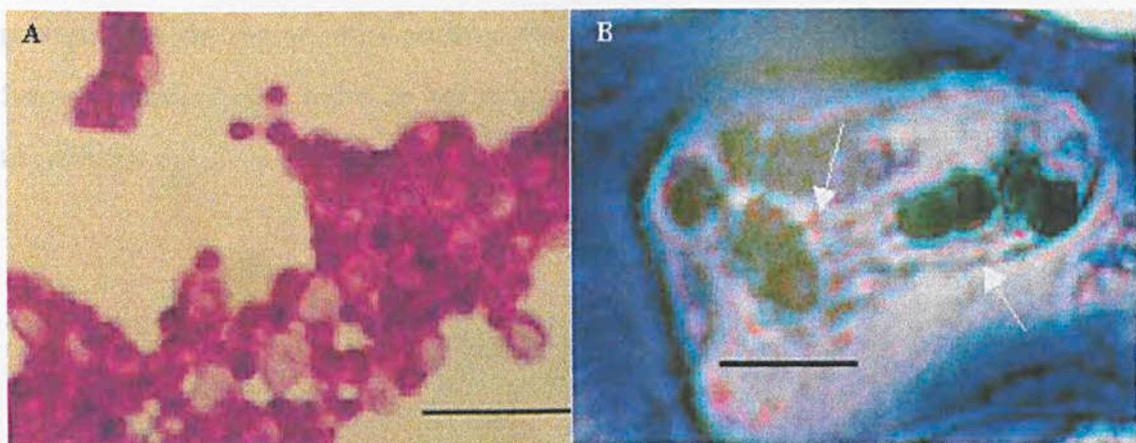
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cortes histológicos de frutos de café

A posição transversal do corte do fruto de café e a espessura de 10 μm mostraram-se mais adequadas para observação, tanto das estruturas vegetais, quanto dos microrganismos internos a esses tecidos.

Não se observaram diferenças nos cortes obtidos em criomicrotomo, considerando-se a presença de microrganismos, nos cortes, quando lavados ou quando transferidos diretamente para a lâmina. Adotou-se, então, esse último procedimento, pois, embora a técnica de lavagem do corte tenha sido efetuada para se prevenir a ocorrência de artefatos de técnica (WACHSTEIN e MEISEL, 1953), a solução utilizada poderia redistribuir os microrganismos no corte, alterando o resultado original.

Apesar da utilização de diversos corantes, não foi possível verificar um padrão de coloração de bactérias e de leveduras, quando as mesmas foram observadas isoladamente ou diretamente em cortes de fruto de café (Figura 3).



Coloração com Giemsa. Barra de escala = 10 μm .

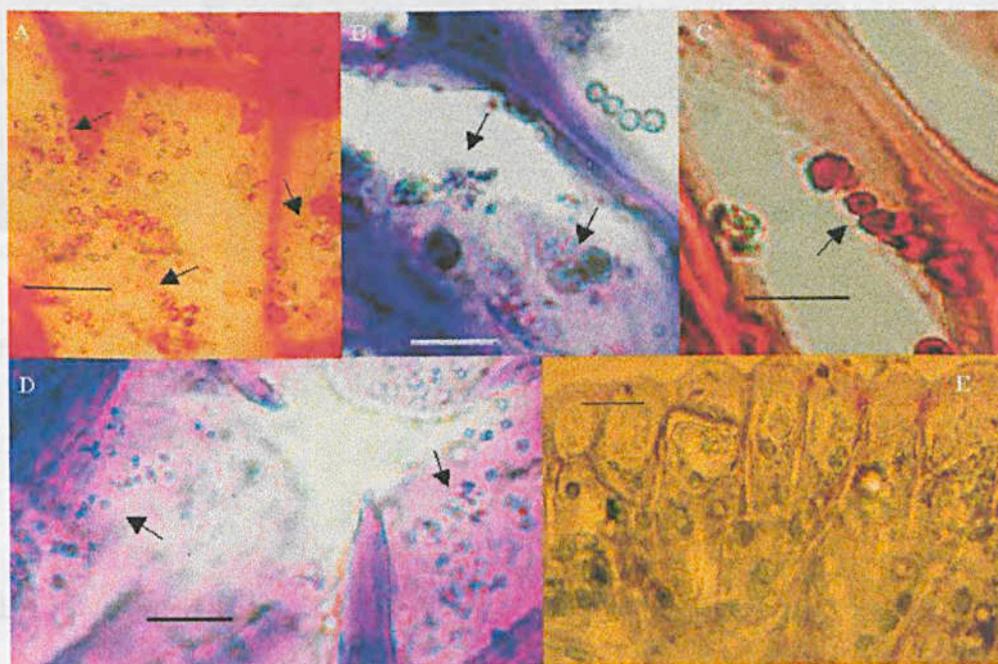
Figura 3 - Células de leveduras A) crescidas em meio de cultura; e B) em células da região da polpa de frutos de café (setas).

Uma possível explicação para essa diferença no padrão de coloração de microrganismos, quando isolados e quando *in situ*, é a alteração na coloração em função do pH do meio em que se encontram os microrganismos (SEELEY JUNIOR e VAN DEMARK, 1972). Esses autores explicam que a carga da célula bacteriana pode sofrer alterações, de tal forma que, a um pH elevado, a carga negativa dentro da célula aumenta, aumentando, assim, sua atração por corantes básicos (catiônicos). Comentam, também, que, em pH mais baixo, a intensidade de coloração pode ser modificada. Esse fenômeno não ocorre nas situações em que os microrganismos são crescidos em meio de cultura.

A alteração do pH na polpa é resultante do processo de fermentação efetuado por enzimas naturais do café cereja e por enzimas extracelulares elaboradas por microrganismos (MENCHÚ e ROLZ, 1973; CARVALHO e CHALFOUN, 1985). Porém, não é possível explicar completamente, e com certeza, quando a afinidade dos corantes para certos componentes das células e tecidos, são alterados por mudanças no pH (GALIGHER e KOZLOFF, 1971).

Todas as colorações testadas detectaram a presença de bactérias e leveduras na polpa dos frutos de café da variedade Catuaí (Figura 4). Resultado similar também foi observado na polpa de café da variedade IAPAR 59,

proveniente da região de Londrina-PR. Outros autores também têm observado fungos filamentosos, além de bactérias e leveduras (TAUK, 1984 e ROUSSOS et al., 1995).

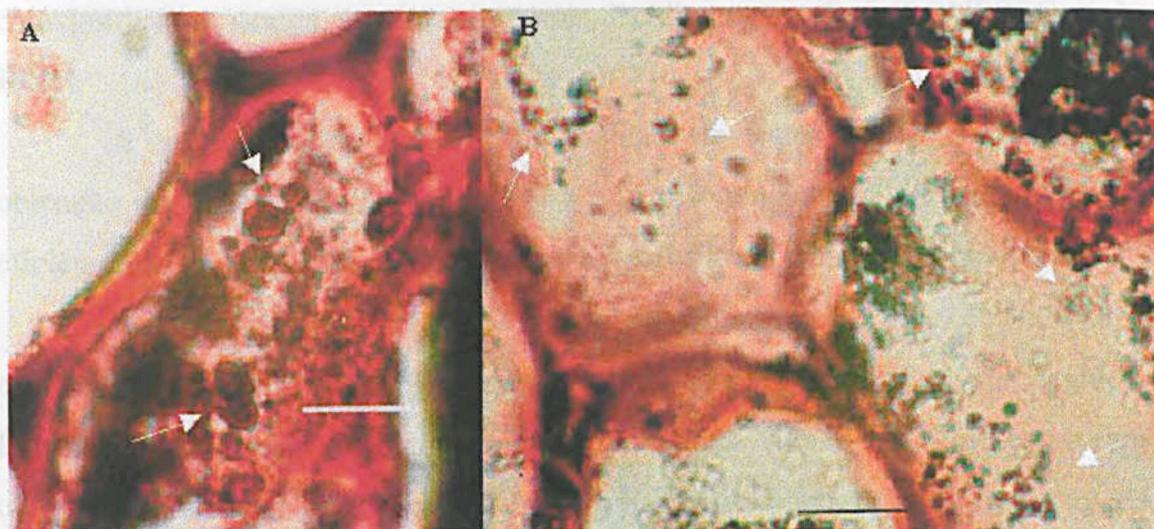


Barra de escala = 10 μm .

Figura 4 - Cortes de região da polpa de frutos de café corados pela A) técnica de Gram; B) Giemsa; C) safranina aquosa; D) cristal violeta e E) azul de toluidina O, sendo B = bactérias; L = leveduras.

Todos os corantes biológicos apresentaram resultados satisfatórios, proporcionando a observação das estruturas internas ao fruto de café e, em alguns casos, a coloração diferencial entre tecidos e microrganismos.

Os cortes dos frutos, obtidos tanto em criomicrotomo quanto no material fixado e incluído em parafina, demonstraram existir um predomínio de leveduras na porção mais externa da polpa do fruto. Foram observadas, também, diferenças na colonização da polpa de frutos verde e cereja nos cortes inclusos em parafina (Figura 5 e Quadro 1).



Barra de escala = 10 μ m. As setas indicam as leveduras e as bactérias.

Figura 5 - Células da região da polpa de fruto de café cereja corado com safranina de Johansen pelo método da parafina. A) leveduras; e B) bactérias.

Quadro 1 – Distribuição da microbiota em cortes da região da polpa de frutos de café *Coffea arabica*, observada em material incluído em parafina

Amostras	Resultados
Café verde	Muitas bactérias e distribuídas por toda a polpa Poucas leveduras e principalmente na periferia.
Café cereja	Bactérias distribuídas por toda a polpa Elevada ocorrência de leveduras na periferia.

A existência de um gradiente de densidade de populações microbianas também tem sido observada por outros autores em tomate (SAMISH et al., 1962). Para tecidos da polpa de café, verificou-se a ocorrência de uma sucessão, na comunidade de microrganismos, à medida que a polpa avançava para a decomposição (TAUK, 1984), sugerindo preferência por determinados constituintes da polpa do café, a qual propicia uma rica fonte de fermentação

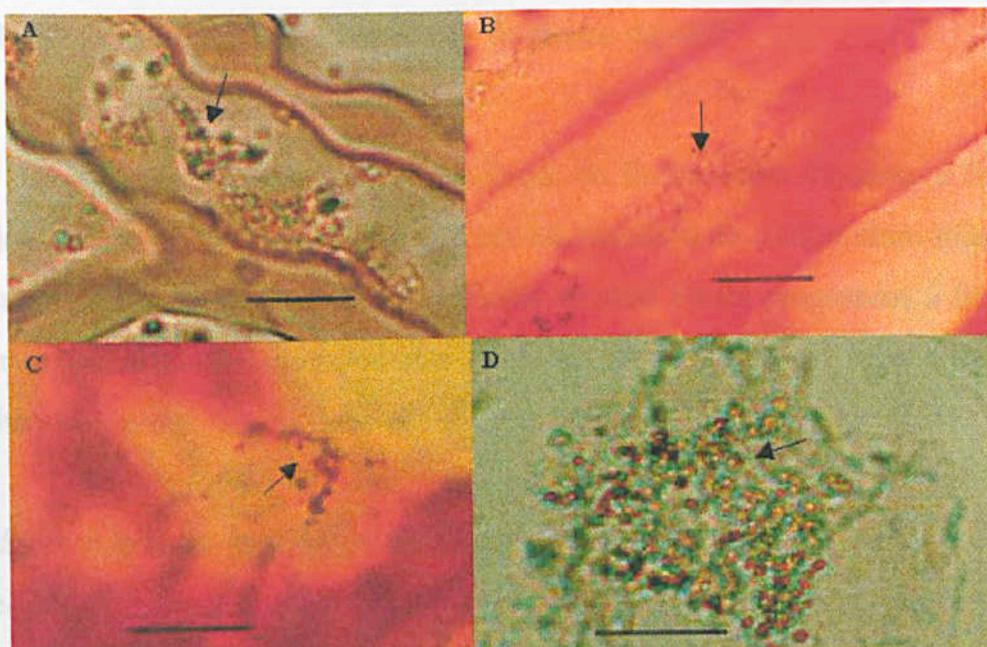
constituída de açúcares, pectinas, minerais, lipídios e proteínas (ROUSSOS et al., 1995).

A característica de rigidez da semente de frutos de café, dificultou a obtenção de cortes histológicos íntegros e, provavelmente, pode ter reduzido a eficiência da etapa de fixação na técnica de inclusão do material em parafina.

Esperava-se que a semente se apresentasse estéril, considerando-se a existência de mecanismos protetores na semente e também a sua rigidez. Entretanto, em todas as técnicas empregadas em cortes de semente, foram observadas estruturas semelhantes às das bactérias (Figura 6). A ausência de microrganismos, em cortes obtidos em criomicrotomo, da variedade IAPAR 59 (Figura 7), demonstrou que as bactérias observadas nesses tecidos não foram resultado de um arraste ocasional durante os cortes, feito pela lâmina do criomicrotomo.

A observação de cortes de semente da variedade Catuaí, preparadas pela inclusão em parafina, na qual todos os constituintes internos ao fruto são fixados e o risco de introdução de contaminantes externos ao fruto tornam-se reduzidos, corrobora também a hipótese de que microrganismos possam estar presentes também em sementes.

Isso concorda com os resultados obtidos por MUNDT e HINKLE (1976), GARDNER et al. (1982) e McINROY e KLOEPPER (1995). Estes dois últimos autores sugeriram que a presença de endofíticos ocorre antes da germinação. MUNDT e HINKLE (1976) propõem, ainda, que a observação dessas bactérias, no tecido, deve-se ao fato de que elas são capazes de atravessar as barreiras mecânicas da planta, são transportadas e depositadas dentro do óvulo.



Setas indicam bactérias. Barra de escala = 10 μ m.

Figura 6 - Corte transversal de semente de fruto de café corado com A) safranina aquosa; B) técnica de Gram; C) cristal violeta; D) método de inclusão em parafina.

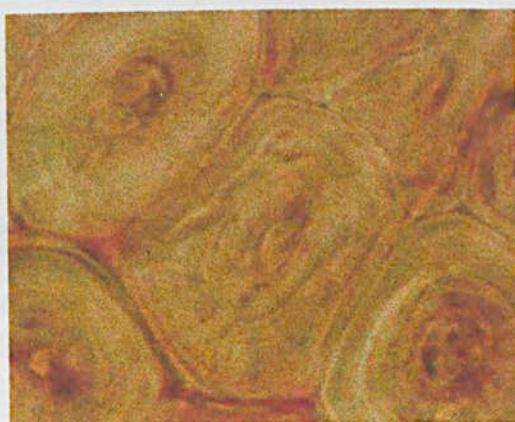
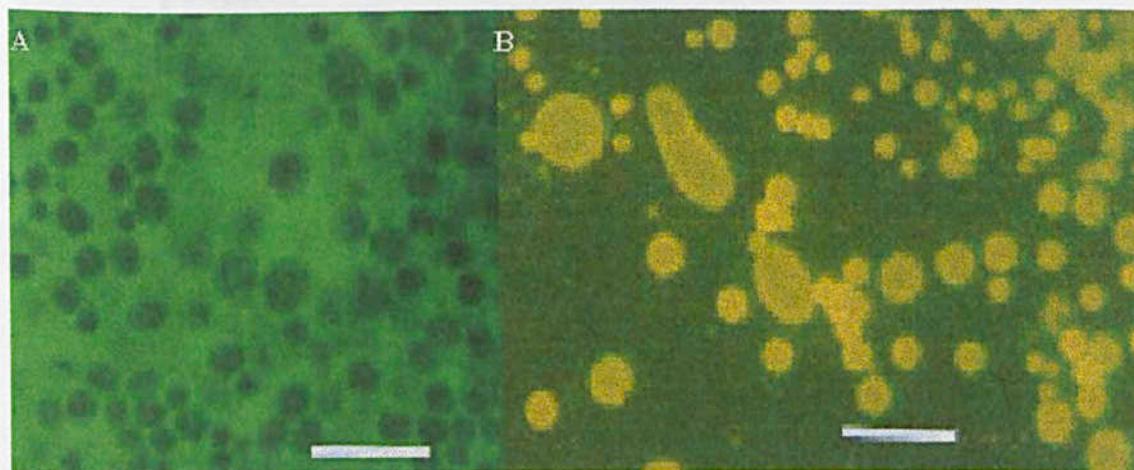


Figura 7 - Corte transversal de semente de fruto de café verde IAPAR 59 corado com Giemsa, mostrando ausência de microrganismos nas células vegetais e conseqüente inexistência de contaminação durante execução da técnica.

4.2. Fluoresceína diacetato em cortes de frutos de café

Nas lâminas preparadas com solução de fluoresceína diacetato e de goma arábica, não se observou reação, tanto em microscópio de campo claro quanto em fotomicroscópio de epifluorescência. Essas lâminas foram preparadas a fim de se observar se artefatos oriundos das soluções poderiam estar interferindo nos resultados, mascarando a coloração fluorescente.

Comparando-se lâminas contendo esfregaço de *K. oxytoca* e das leveduras crescidas em meios de cultura, com e sem adição do fluorocromo, pode-se observar que as leveduras não apresentam autofluorescência (Figura 8(A)). Em presença do fluorocromo, a fluoresceína desesterificada acumula dentro da célula, fluorescendo (OPARKA e READ, 1994), indicando, então, uma possibilidade de aplicação dessa técnica para diferenciação entre leveduras e o tecido vegetal (Figura 8(B)).

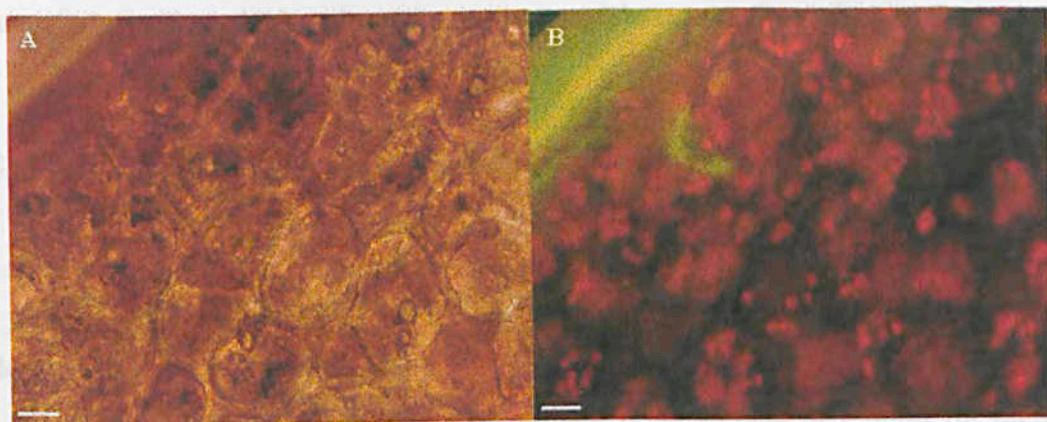


Fotomicroscópio de epifluorescência com filtro de excitação de 450 - 480 nm. Barra de escala = 20 μm .

Figura 8 - Células de leveduras crescidas em meio de cultura A) sem fluorocromo; e B) com fluorocromo.

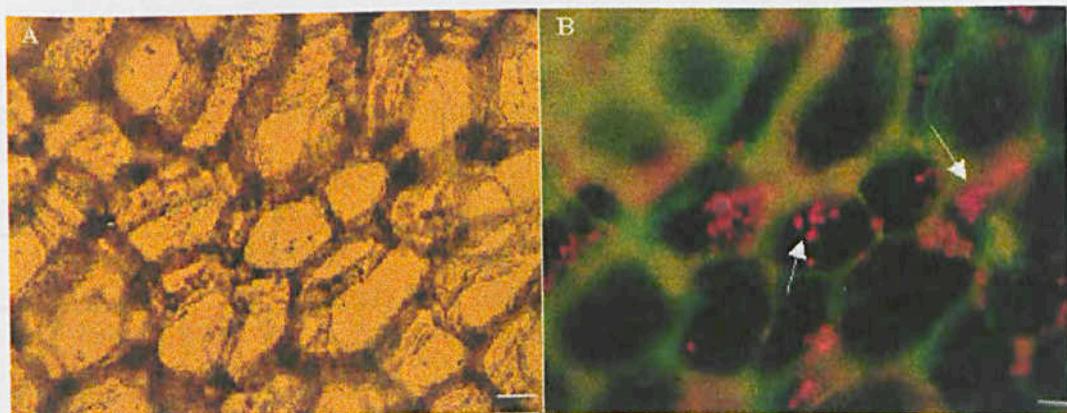
Adição de fluorocromo, de forma semelhante ao ocorrido com corantes, quando aplicados a cortes histológicos, não apresentou um padrão de coloração

de microrganismos quando isolados e quando *in situ*. Além disso, a ausência de contrastes visuais no tecido observado, em virtude da baixa intensidade de fluorescência da microbiota, dificultaram a observação em fotomicroscópio de epifluorescência de microrganismos presentes na polpa (Figuras 9 e 10).



A) microscópio de campo claro e B) fotomicroscópio de epifluorescência com filtro de excitação de 450 - 480 nm. Barra de escala = 20 μ m. Deve-se observar autofluorescência dos tecidos vegetais.

Figura 9 - Corte de região de polpa de fruto de café verde observado na mesma posição.



A) microscópio de campo claro e B) fotomicroscópio de epifluorescência com filtro de excitação de 450 - 480 nm. Barra de escala = 20 μ m. As setas indicam componentes do tecido vegetal.

Figura 10 - Corte de região da polpa de fruto de café verde com fluoresceína diacetato observado na mesma posição.

Embora, para essa situação, o pH da polpa possa não estar interferindo na fluorescência, a autofluorescência comum aos tecidos vegetais (HOOD e SHEW, 1996) limitou a eficiência desse método para fins de observação *in situ*. Cloroplastos, grãos de amido e vacúolos são sítios comuns de autofluorescência (OPARKA e READ, 1994) que poderiam estar sendo visualizados na lâmina. Aliada a essa particularidade, em função da inespecificidade da reação, a interação microrganismo - fluorocromo não pôde ser confirmada.

4.3. Verificação da presença de anticorpos

Em nenhum dos testes sorológicos, foi observado produção de anticorpos pelos camundongos imunizados.

Pela técnica de microaglutinação em gota, houve produção de resposta imunológica positiva pelos coelhos imunizados (Quadro 2). Entretanto, os testes de contraimunoeletroforese (CIE) e de imunodifusão dupla (IDD), que empregaram o antígeno *K. oxytoca* na forma solúvel, não forneceram respostas positivas. Esse fato não foi ocasionado por erros na técnica, uma vez que o antígeno *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (XCV) solúvel (controle positivo) formou a banda de precipitação para o seu respectivo antissoro.

Quadro 2 - Títulos obtidos de coelhos imunizados com *Klebsiella oxytoca* íntegra

Inoculação	Microaglutinação em gota	
	Coelho A	Coelho B
7 ^a (IV)	16	32
8 ^a (CP)	256	256
9 ^a (CP)	128	128
10 ^a (SC)	128	64
11 ^a (SC)	64	64

A avaliação da resposta imunológica, a partir do antissoro α *K. oxytoca* purificado, também não apresentou resposta positiva. Como a resposta foi positiva para XCV (controle positivo), igualmente purificado, concluiu-se que o procedimento efetuado foi correto.

Uma das hipóteses é a de que outro tipo de imunoglobulina, presente no antissoro, seria a responsável pela sua ligação ao determinante antigênico na bactéria, uma vez que o processo de purificação retém somente imunoglobulinas do tipo IgG. Ou, ainda, que uma seqüência de aminoácidos específica, envolvida na estrutura secundária ou terciária da imunoglobulina, tenha sido alterada durante o processo de purificação, de tal forma que inviabilizasse sua ligação ao antígeno (SCHAAD, 1976). Considerando-se esses resultados, optou-se pela não-continuidade de uso da técnica de purificação.

A ausência de resultados positivos nos testes de IDD e CIE, para os mesmos antissoros usados na microaglutinação em gota que, ao contrário, forneceram resposta positiva, demonstram impossibilidade de mobilidade do antígeno *K. oxytoca* no gel. Isso foi confirmado num teste em que, numa placa, o antissoro α *K. oxytoca* foi incorporado ao ágar, e o antígeno *K. oxytoca* foi colocado no orifício central. Em outra placa, inverteu-se a posição dos reagentes, o antígeno no ágar e o anticorpo α *K. oxytoca* no orifício, observando-se a formação de um halo em torno do orifício somente para esse último teste.

Para o sobrenadante coletado das centrifugações diferenciais da solução de antígeno *K. oxytoca* solúvel, as quais poderiam conter partículas de elevado peso molecular - que poderiam estar interferindo na reação - também não foi observado resposta positiva em IDD.

Outro procedimento testado, para imunização de coelhos, foi o crescimento da bactéria em placa, com conseqüente raspagem superficial do meio com alça de Drigalski e coleta das células. Após solubilização das mesmas, foi verificado o surgimento das linhas de precipitação em todas as técnicas, que empregavam essa forma de antígeno (Quadro 3), confirmando que, quando a

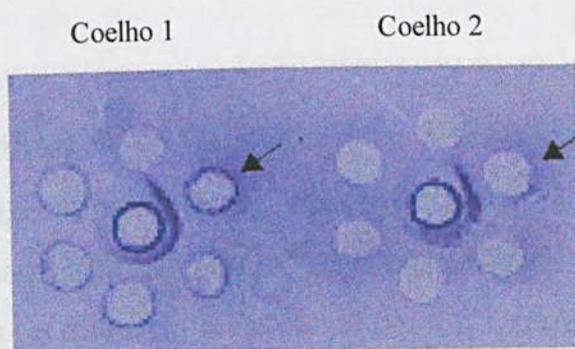
bactéria é crescida em placa, há maior eficiência de obtenção de resposta positiva.

Quadro 3 - Títulos obtidos de coelhos imunizados por *Klebsiella oxytoca*, quando a bactéria foi crescida em placa e solubilizada

Inoculação	MAG		IDD		CIE	
	Coelho A	Coelho B	Coelho A	Coelho B	Coelho A	Coelho B
4ª (IV)	64	256	64	16	Positivo	
5ª (IV)	128	64	8	16		
6ª (SC)	256	128	8	16	nd*	

IDD = imunodifusão dupla; MAG = microaglutinação em gota; CIE = contraimunoeletroforese; IV = injeção intravenosa; SC = injeção subcutânea; nd* = não-determinado.

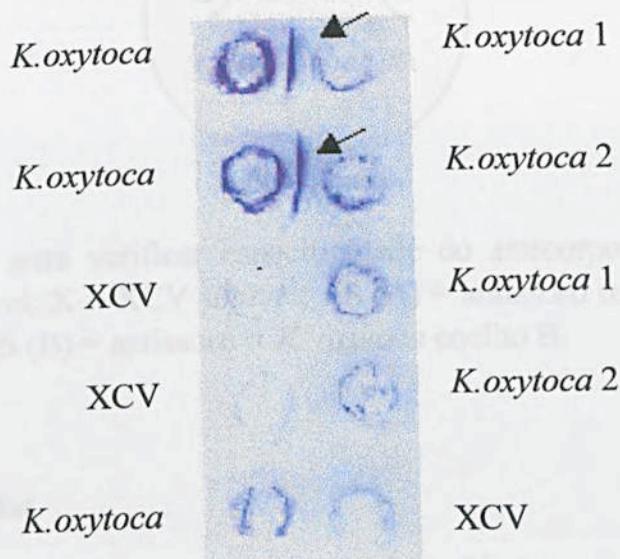
A formação da linha de precipitação resultante da interação antígeno-anticorpo pode ser observada em IDD (Figura 11). A coloração com azul de Coomassie melhorou a visualização das bandas de precipitação.



A partir da seta, em sentido horário, situam-se antissoro α *K. oxytoca* não-diluído, diluído 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 e 1/64.

Figura 11 – IDD com coloração, por azul de Coomassie, das bandas de precipitação. Antígeno *Klebsiella oxytoca* solúvel no orifício central.

O antissoro α XCV testado contra *K. oxytoca* e XCV (controle positivo) em CIE demonstrou que o procedimento de CIE foi correto, em virtude da reação positiva entre antígeno XCV e seu respectivo antissoro. Além disso, observa-se a especificidade dos antissoros α *K. oxytoca*, uma vez que esses não reagiram com o antígeno XCV (Figura 12).



Setas indicam as bandas de precipitação coradas com azul de Coomassie. Os orifícios da esquerda referem-se aos antígenos solúveis e os da direita, aos antissoros. Os números 1 e 2 são as identificações dos coelhos inoculados.

Figura 12 – Contraimunoeletroforese com *K. oxytoca* e XCV e antissoros α *K. oxytoca*.

Não foi verificada a presença de bandas pela técnica de CIE, quando se utilizou, como antígeno para reação com antissoro α *K. oxytoca*, a solução proveniente da raspagem do meio estéril de crescimento de bactérias. Isso revela que os constituintes presentes no meio de cultura não interferem na reação, e que o procedimento de inoculação e obtenção de anticorpos foi correto, ou seja, os anticorpos que apresentaram reação são contra antígenos *K. oxytoca*.

Quando foi aplicado *K. oxytoca*, XCV e os antissoros α *K. oxytoca* a IDD, foi observada a formação de bandas de precipitação somente para *K. oxytoca* (Figura 13), indicando que há especificidade do anticorpo.

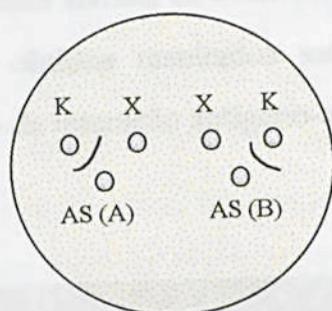


Figura 13 – IDD para verificar especificidade do anticorpo. K = *K. oxytoca* solúvel; X = XCV solúvel; AS (A) = antissoro α *K. oxytoca* coelho A; AS (B) = antissoro α *K. oxytoca* coelho B.

4.3.1 Imunodot-blot

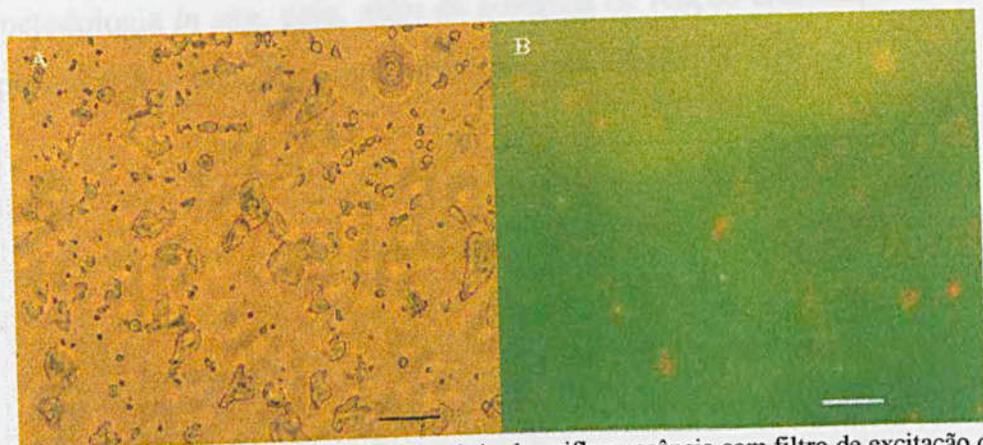
Não foi observada qualquer reação positiva dos antissoros α *K. oxytoca* não-diluídos e diluídos, soro, antissoro XCV, com *K. oxytoca* solúvel.

O antígeno XCV não-diluído e diluído, com seu respectivo antissoro não-diluído e diluído, também não produziu reação positiva, o que não era esperado, pois reações positivas, com o mesmo antígeno e anticorpo, já haviam sido observadas em IDD. Portanto, deve ter ocorrido uma inadequação na execução da técnica, seja nas diluições, seja no uso da membrana de nitrocelulose, a qual pode não estar permitindo a ligação do antígeno a sua superfície e, conseqüentemente, interferindo nas etapas subseqüentes.

Sendo essa metodologia realizada apenas como procedimento adicional para verificar a produção do anticorpo, optou-se pela não continuidade de novos ajustes.

4.3.2 Imunofluorescência indireta

Embora tenham-se realizado diluições para a solução de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e tenha-se empregado o antígeno *K. oxytoca*, proveniente de diferentes meios e em diferentes formas de obtenção, para reação com antissoros α *K. oxytoca*, não foram obtidos resultados satisfatórios (Figura 14), que possibilitassem a observação da interação antígeno-anticorpo *in situ*.



A) microscópio de campo claro e B) fotomicroscópio de epifluorescência com filtro de excitação de 450 - 480 nm. Barra de escala = 10 μ m.

Figura 14 - Imunofluorescência indireta com *K. oxytoca* e IgG de cabra α coelho conjugada com FITC 1/40.

Também não foi observado aumento da fluorescência para o antissoro α *K. oxytoca* liofilizado, o qual apresentou título de 8.192 pela técnica de microaglutinação em gota. Títulos inferiores a esse (4.000, 5.120), usados para essa técnica, têm sido relatados por produzirem resposta positiva (MORTON, 1964; MALIN et al., 1983).

As possíveis explicações para os resultados negativos, obtidos nesses procedimentos, contrários aos observados por outras metodologias sorológicas, podem ser decorrentes da presença de antígeno, em excesso, que pode estar bloqueando a fluorescência, por competição (HARLOW e LANE, 1988); ou,

ainda, epítopes, presentes na membrana do antígeno, podem estar sendo lavados ou alterados durante o seu processo de fixação à lâmina, impossibilitando o seu reconhecimento pelos anticorpos (HAMMOND e JORDAN, 1990). Outro fator que pode alterar a intensidade da emissão fluorescente, deve-se à concentração do FITC (CHERRY, 1970).

As reações negativas do antígeno *K. oxytoca* com o soro, e da bactéria XCV com o antissoro α *K. oxytoca*, indicaram certa especificidade do anticorpo obtido. Em conseqüência, novos testes e adaptações às técnicas de imunofluorescência indireta devem ser efetuados para, então, iniciar aplicação dessa metodologia *in situ*, pois, além da ausência de reação cruzada, o anticorpo deve apresentar alta afinidade para o antígeno (SCHLOTTER et al., 1997).

A presença de microorganismos patogênicos e de seus produtos metabólicos, em frutos de café, pode estar relacionada positivamente à expressão final da qualidade de bebida de café.

Assim, este trabalho teve como objetivo observar, diretamente sobre os cortes de frutos de café, *Coffea arabica* L., a presença de microorganismos entomofílicos, assim como a sua distribuição *in situ*, utilizando técnicas de microscopia e imunológicas.

Foram utilizados os corantes Giemsa, safranina aquosa, azul de toluidina O, cristal violeta, técnica de Gram e fluoresceína diluída, em cortes obtidos por zimolipotaxia. No preparo dos materiais incluídos em parafina, realizou-se a desidratação por série alcohólica, a parafinização e a coloração com safranina de Johnson e "fast green". Para os testes imunológicos, utilizaram-se imunodifusão dupla e radial simples, imunoprecipitação em gota, contraimunoelectroforese, imunodot-blot e imunofluorescência indireta.

A técnica de colorações biológicas mostrou-se um método rápido para observação de bactérias e leveduras no poço de frutos de café, porém com baixa especificidade de reação. Tanto as colorações biológicas empregadas mostraram-se eficientes, entretanto, não foi possível obter um padrão de coloração dos microorganismos quando fixados e quando *in situ*.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

A presença de microrganismos endofíticos e de seus produtos metabólicos, em frutos de café, pode afetar negativa ou positivamente a expressão final da qualidade da bebida do café.

Assim, este trabalho teve como objetivo observar, diretamente sobre os cortes de frutos de café, *Coffea arabica* L., a presença de microrganismos endofíticos, assim como a sua distribuição *in situ*, utilizando técnicas de microscopia e imunológicas.

Foram utilizados os corantes Giemsa, safranina aquosa, azul de toluidina O, cristal violeta, técnica de Gram e fluoresceína diacetato, em cortes obtidos por criomicrotomo. No preparo dos materiais incluídos em parafina, realizou-se a desidratação por série etílica, a parafinização e a coloração com safranina de Johansen e "fast green". Para os testes imunológicos, utilizaram-se imunodifusão dupla e radial simples, microaglutinação em gota, contraimunoeletroforese, imunodot-blot e imunofluorescência indireta.

A técnica de colorações biológicas mostrou-se um método rápido para observação de bactérias e leveduras na polpa de frutos de café, porém com baixa especificidade de reação. Todas as colorações biológicas empregadas mostraram-se eficientes, entretanto, não foi possível obter um padrão de coloração dos microrganismos quando isolados e quando *in situ*.

Foi possível observar, tanto nos cortes obtidos em criomicrotomo, quanto com o material incluído em parafina, a existência de um gradiente de distribuição dos microrganismos, na polpa do café, com predomínio de leveduras em sua porção mais externa.

A técnica de fixação e inclusão do material em parafina mostrou-se eficiente, pela facilidade de visualização e fixação dos constituintes internos ao fruto e pela redução do risco de introdução de contaminantes externos ao fruto.

Nos cortes de sementes de frutos de café, obtidos em criomicrotomo e por meio da inclusão em parafina, observou-se a presença de bactérias nos tecidos, indicando que bactérias podem atravessar as barreiras mecânicas da planta e se localizar na semente. As sementes da variedade IAPAR 59 apresentaram-se isentas de microrganismos.

A aplicação de fluoresceína diacetato não se mostrou eficiente, em função da autofluorescência do tecido vegetal, dificultando a visualização dos microrganismos *in situ*, além da inespecificidade da reação.

Pelos procedimentos imunológicos, foi possível obter anticorpos específicos para a bactéria *K. oxytoca*. Porém, a técnica de imunofluorescência para detecção de microrganismos endofíticos, presentes na polpa de frutos de café, requer maiores adaptações, em função da baixa resposta fluorescente observada.

O fato de a microbiota endofítica estar localizada preferencialmente na polpa, de onde os produtos são difundidos para a semente, constituindo assim, matéria alimentar para o embrião, indica que estudos sobre sua localização no tecido da polpa constituem uma informação adicional, para maior compreensão dessa associação e de sua influência na qualidade da bebida do café.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V., TEIXEIRA, A. A. Transformações bioquímicas, químicas e físicas do grão de café verde e a qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, **Anais...** Curitiba. 1975, p. 21.
- AMORIM, H. V., SILVA, O. M. Relation between the polyphenol oxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. **Nature**, v. 219, p. 381-382, 1968.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO CAFÉ. Rio de Janeiro: Coffee business, 1997.
- ARUNGA, R. O. Coffee. In: **Economic microbiology**. London: Fermented Foods, Academic Press, 1982. v. 7. 327 p. p. 259.
- BARTHOLO, G. F., MAGALHÃES FILHO, A. A. R., GUIMARÃES, P. T. G. Cuidados na colheita, no preparo e no armazenamento do café. **Informe Agropecuário**, v. 14, n. 162, p. 33-44, 1989.
- BELL, C. A., DICKIE, G. A., HARVEY, W. L. G., CHAN, J. W. Y. F. Endophytic bacteria in grapevine. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 46-53, 1995.
- BITANCOURT, A. A. As fermentações e podridões da cereja de café. **Boletim da Superintendência dos Serviços do Café**, v. 32, n. 359, p. 7-14, 1957.

- BUGBEE, W. M., GUDMESTAD, M. C., SECOR, G. A., NOLTE, P. Sugar beet as a symptomless host for *Corynebacterium sepedonicum*. **Phytopathology**, v. 77, n. 5, p. 765-770, 1987.
- CAMERON, H. R. *Pseudomonas* content of cherry trees. **Phytopathology**, v. 60, p. 1343-1346, 1970.
- CARROLL, G. Forest endophytes: pattern and process. **Can. J. Bot.**, v. 73, S1, p. 1343-1346, 1995.
- CARVALHO, V. D., CHALFOUN, S. M. Aspectos qualitativos do café. **Informe Agropecuário**, v. 11, n. 126, p. 79-92, 1985.
- CASTRO, L. H. **Efeito de despulpamento em secador de leito fixo sob alta temperatura no consumo de energia e na qualidade do café (*Coffea arabica* L.)**. Viçosa: UFV, 1991. 61p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- CHALFOUN, S. M., CARVALHO, V. D., GUIMARÃES, P. T. G. **Manual de preservação e melhoria da qualidade do café nas fases de pré e pós colheita**. São Paulo, Emfim Ribeirão, Ribeirão Preto, 1992. 44 p.
- CHERRY, W. B. **Standardization in immunofluorescence**. Local: Blackwell Scientifica Publications, 1970. 312p.
- DE BOER, S. H., COPEMAN, R. J. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. **Can. J. Plant Sci.**, v. 54, p. 115-122, 1974.
- DE BOER, S. H., McNAUGHTON, M. E. Evaluation of immunofluorescence with monoclonal antibodies for detecting latent bacterial ring rot infections. **Am. Potato J.**, v. 63, p. 533-542, 1986.
- DE BOER, S. H., WARD, L. J. PCR detection of *Erwinia carotovora* subs. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, v. 85, p. 854-858, 1995.

DRACZ, S. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de soro de queijo em leite.** Viçosa: UFV, 1996. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1996.

FAZUOLI, L. C. Qualidade no pé. **Jornal do Café**, n. 91, 1999.

FISHER, P. J., PETRINI, O., SCOTT, H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytolog.**, v. 122, p. 299-305, 1992.

GAGNÉ, S., RICHARD, C., ROUSSEAU, H., ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfafa roots. **Can. J. Microbiol.**, v. 33, p. 996-1000, 1987.

GALIGHER A. E., KOZLOFF, E. N. **Essentials of practical microtechnique.** 2. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1971. 531 p.

GARDNER, J. M., FELDMAN, A. W., ZABLOTOWICZ, R. M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus tree. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, n. 6, p. 1335-1342, 1982.

GARRUTI, R. S., GOMES, A. G. Influência do estado de maturação sobre a qualidade da bebida do café na região do Vale do Paraíba, **Bragantia**, v. 20, n. 44, p. 989-995, 1961.

HALLAS, B. H. Elimination of air bubbles shile embedding brain tissue. **Stain Technol.**, v. 50, n. 6, p. 397, 1976.

HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HAMMOND, J., JORDAN, R. L. **Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens - a laboratory manual.** Local: APS Press, 1990. 389p.

- HARLOW, E., LANE, D. **Antibodies** - a laboratory manual. Local: Cold Spring Laboratory, United States of America, 1988. 465p.
- HOLLIS, J. P. Bacterial in healthy potato tissue. **Phytopathology**, v. 41, p. 350-366, 1951.
- HOOD, M. E., SHEW, H. D. Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant-fungal interactions. **Phytopathology**, v. 86, p. 704-708, 1996.
- JENSEN, W. A. **Botanical histochemistry**. San Francisco: W. H. Freeman. 1962. 357p.
- JIMENEZ-SALGADO, T., FUENTES-RAMIREZ, L. E., TAPIA-HERNANDES, A., MASCARUA-ESPARZA, M. A., MARTINEZ-ROMERO, E., CABALLERO-MELLADO, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing Acetobacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 9, p. 3676-3683, 1997.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.
- KLOEPPER J. W., BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v. 38, p. 1219-1232, 1992.
- KRUG, H. P. Cafés duros II - Um estudo sobre a qualidade dos cafés de varrição. **Revista do Instituto do Café**, v. 15, p. 1393-1396, 1940a.
- KRUG, H. P. Cafés duros. **Revista do Instituto do Café**, v. 36, p. 636-638, 1940b.
- KRUG, H. P. Cafés duros III - Relação entre porcentagem de microrganismos e qualidade do café. **Revista do Instituto do Café**, v. 27, p. 1827-1831, 1941.

KRUG, H. P. Conceção moderna sobre a origem dos cafés duros. **Revista de Agricultura**, v. 20, p. 416-426, 1945.

LEITE, R. A. **Qualidade tecnológica do café (*Coffea arabica* L.) pré-processado por "via seca" e "via úmida"**. Viçosa: UFV, 1998. 54p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.

LUCAS, M. B. **Efeitos de diferentes índices de infestação pela broca-do-café *Hypothenemus hamperi* (Ferrari, 1967) (Coleoptera-scolytidae) no peso e na classificação do café pelo tipo e pela bebida**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1986. 67p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1986.

MALIN, E. M., ROTH, D. A., BELDEN, E. L. Indirect immunofluorescent staining for detection and identification of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in naturally infected bean seed. **Plant Dis.**, v. 67, p. 645-647, 1983.

MEIRELLES, A. M. A. **Ocorrência e controle da microflora associada aos frutos de café (*Coffea arabica* L.) provenientes de diferentes localidade do estado de Minas Gerais**. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1990. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Lavras, 1990.

MENCHÚ, J. F. e ROLZ, C. Coffee fermentation technology. **Café Cacao Thé**, n. 1, p. 53 - 59, 1973.

MENELEY, J. C., STANGHELLINI, M. E. Detection of enteric bacteria within locular tissue of healthy cucumbers. **J. Food Sci.**, v. 39, p. 1267 - 1268, 1974.

MEZÊNCIO, J. M. S. **Cinética da produção de anticorpos em coelhos e relacionamento antigênico entre estirpes de *Rhizobium japonicum***. Viçosa: UFV, 1981. 52p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, 1981.

- McINROY, J. A., KLOEPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 895-901, 1995.
- McKNNEY, M. M., PARKINSON, A. J. IgG precipitation by methods non chromatographic. **J. Immunol. Methods**, v. 96, p. 271-278, 1987.
- MISAGHI, I. J., DONNDELINGER, C. R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. **Phytopathology**, v. 80, p. 808-811, 1990.
- MÔNACO, L. C. Café com gosto de cebola. **O Estado de São Paulo**, p. 8-13, c. 3,4, 1961. Suplemento agrícola.
- MORTON, D. J. Use of antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate in ultraviolet examinations of pepper leaf sap for *Xanthomonas vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 54, n. 8, p. 902, 1964.
- MUNDT, J. O., HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 32, p. 694-698, 1976.
- OLIVEIRA, R. C. **Avaliação experimental do peptídeo sintético 4912 como imunógeno para controle do carrapato *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1887) em bovinos.** Viçosa: UFV, 1998, 58p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 1998.
- OPARKA, K. J., READ, N. D. **Plant cell biology - a practical approach.** Oxford: Oxford University Press, 1994. 329 p.
- OUCHTERLONY, O. **Handbook of immunodiffusion of immunoelectrophoresis.** Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers Inc., 1968. 215p.
- PETRINI, O. Research on Endophytes. **Swiss Biotech**, v. 4, n. 3, p. 8-10, 1986.

- REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v. 17, n. 1, p. 29-54, 1998.
- ROUSSOS, S. AQUIÁHUATL, M. A., HERNÁNDEZ, M. R. T., PERRAUD, I. G., FAVEWLA, E., RAMAKRISHNA, M., RAIMBAULT, M., VINIEGRÁ-GONZALES, G. Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 756-762, 1995.
- SAMISH, Z., ETINGER-TULCZYNSKA, R., BICK, M. Microflora within healthy tomatoes. **Appl. Microbiol.**, v. 9, p. 20-25, 1962.
- SASS, J. E. **Botanical microtechnique**, 3. ed. Ames: Iowa State University Press, 1958. 411p.
- SCHAAD, N. W. Immunological comparison and characterization of ribosomes of *Xanthomonas vesicatoria*. **Phytopathology**, v. 66, n. 6, p. 770-776, 1976.
- SCHLOTTER, M., WIEHE, W., ASSMUS, B., STEINDL, H., BECKE, H., HOFLICH, G., HARTMANN, A. Root colonization of different plants by plant-growth-promoting *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R39 studied with monospecific polyclonal antisera. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 2038-2046, 1997.
- SEELEY JUNIOR, H. W., VAN DEMARK, P. J. **Microbios en accion** - manual de laboratorio para microbiología. Madrid: Blume, 1972. 361p.
- SOUZA, S. M. C., CARVALHO, V. L. Efeito de microrganismos na qualidade da bebida do café. **Informe Agropecuário**, v. 18, n. 187, p. 21-26, 1997.
- STONE, J. K. Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir. **Can. J. Bot.**, v. 65, p. 2614-2621, 1987.

- SUNDIN, G. W., JONES, A. L., OLSON, B. D. Overwintering and population dynamics of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *morsprunorum* on sweet and sour cherry trees. **Can. J. Plant Pathol.**, v. 10, n. 4, p. 281-288, 1988
- TAGLIALEGMA, G. H. F. **Estudo sobre o comportamento do mercado internacional de café nos últimos 50 anos: 1946-1995.** Planejamento e Assistência Agrícola - PLAEA. Piracicaba: Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Abril, 1996.
- TAUK, S. M. Identification of fungi isolated from coffee pulp. **Naturalia**, v. 9, p. 57-60, 1984.
- TERVET, I. W., HOLLIS, J. P. Bacteria in the storage organs os healthy plants. **Phytopathology**, v. 38, p. 960-967, 1948.
- VIANA, S. C., PEREIRA, A. A., VANETTI, M. C. D., BORGES, A. C. Métodos para se conservar a viabilidade de bactérias e leveduras do mesocarpo mucilaginoso de frutos de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, 1997, Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. 344p. p. 147.
- WACHSTEIN, M., MEISEL, E. Thin sections from unfixed tissues for histochemical staining. **Stain Technol.**, v. 28, p. 135-139, 1953.
- WHITESIDES, S. K., SPOTTS, R.A. Frequency, distribution, and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. **Phytopathology**, 81, n. 4, p. 453-457, 1991.

APÊNDICE

Quadro 1A - Safranina aquosa

Componentes	Quantidade
Safranina	0,25 g
Água destilada	100 mL

Quadro 2A - Cristal violeta

Componentes (Solução A)	Quantidade
Cristal violeta	2 g
Água destilada	100 mL

APÊNDICE

Componentes (Solução B)	Quantidade
Oxalato de amônio	0,8 g
Água destilada	80 mL

Autoclavar a solução A por 20 min e misturar a solução B.

Quadro 3A - Giemsa

Componentes	Quantidade
Giemsa	1 g
Glicerol	66 mL
Metanol	66 mL

APÊNDICE

Quadro 1A - Safranina aquosa

Componentes	Quantidade
Safranina	0,25 g
Água destilada	100 mL

Quadro 2A - Cristal violeta

Componentes (Solução A)	Quantidade
Cristal violeta	2 g
Água destilada	100 mL
Componentes (Solução B)	Quantidade
Oxalato de amônio	0,8 g
Água destilada	80 mL

Autoclavar a solução A por 20 min e misturar a solução B.

Quadro 3A - Giemsa

Componentes	Quantidade
Giemsa	1 g
Glicerol	66 mL
Metanol	66 mL

Quadro 4A - Azul de toluidina O 0,5%

Componentes	Quantidade
Azul de toluidina O	0,5 g
Álcool 95%	20 mL
Água destilada	80 mL

Quadro 5A - Tampão fosfato 0,1M

Componentes	Quantidade
Safranina	0,25 g
Água destilada	100 mL

Quadro 6A - Ágar tampão salina borato - pH 8,3

Componentes	Quantidade
Solução salina 0,85%	470 mL
Tampão salina borato pH 8,3	25 mL
Ágar nobre	4,25 g
Água destilada	500 mL

Quadro 7A - Tampão salina borato - pH 8,3

Componentes	Quantidade
Ácido bórico	6,184 g
Tetraborato de sódio.10H ₂ O	9,3536 g
Cloreto de sódio	4,384 g
Água destilada	1.000 mL

Quadro 8A - Tampão acetato 60mM - pH 4,0

Componentes	Quantidade
Acetato de sódio	4,92 g
Ácido acético glacial	3,44 mL
Água destilada	1.000 mL

Quadro 9A - Tampão salina fosfato 10x - pH 7,6

Componentes	Quantidade
NaCl	85 g
Na ₂ HPO ₄	12,36 g
Água destilada	1.000 mL

Quadro 10A - Solução corante de Azul de Coomassie G-250

Componentes	Quantidade
Azul de Coomassie G-250	5 g
Álcool absoluto	450 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Água destilada	450 mL

Quadro 11A - Tampão de corrida - pH 8,6

Componentes	Quantidade
Solução de NaCl 0,85%	100 mL
Tris	7,268 g

Correção do 8,6 com o uso de HCl 5N.

Quadro 12A - Tampão carbonato bicarbonato 0,2M - pH 9,6

Componentes	Quantidade
Na ₂ CO ₃	2,1198 g
NaHCO ₃	1,68 g
Água destilada	100 mL

Correção do pH com HCl 1M / NaOH 1M.

Quadro 13A - Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20 (PBST)

Componentes	Quantidade
KH ₂ P ₄	20 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,44 g
NaCl	7,947 g
KCl	0,20 g
Água destilada	1.000 mL

